

Analyse repetitiver Komponenten aus Kalbsthymus-DNA

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
MICHAEL PECH
aus Heidenheim

München 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0009

Analyse repetitiver Komponenten aus Kalbsthymus-DNA

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
MICHAEL PECH
aus Heidenheim

München 1980



1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Kaudewitz
 2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Bandlow
- Sondervotum: Professor Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 5. August 1980

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Dezember 1977 bis April 1980 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich dafür, daß ich diese Arbeit unter seiner Anleitung anfertigen durfte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Doz. Dr. R.E. Streeck für seine stete Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Die Ergebnisse der Arbeit sind teilweise veröffentlicht worden:

M. Pech, R.E. Streeck und H.G. Zachau, Cell 18, 883-893 (1979)

R.E. Streeck, M. Pech und H.G. Zachau, in: FEBS Special Meeting on Enzymes, Dubrovnik, Vol. 60 (Hrsg. P. Mildner und B. Ries), 125-134 (Pergamon Press, Oxford und New York, 1980)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	6
2.1. Aufbau der 1,706 Satelliten-DNA aus Kalbs- thymus	6
2.1.1. Die Sequenzierstrategie für die Analyse der 1,706 Satelliten-DNA	7
2.1.2. Sequenzierung der isolierten Restrik- tionsfragmente	12
2.1.2.1. Spaltung von Restriktionsnukleasen an Fragmentenden	13
2.1.2.2. Einführung von Einzelstrangbrüchen durch die Restriktionsnuklease Sau 3A I	14
2.1.2.3. Restriktionsfragmente von nicht klonierter eukaryontischer DNA	16
2.1.3. Sequenz der 1,706 Satelliten-DNA	20
2.1.3.1. Sequenzvergleich klonierter und nicht klonierter DNA	20
2.1.3.2. Prototypsequenzen der 1,706 Satel- liten-DNA	24
2.1.3.3. Unterschiedliche Divergenzen bei verschiedenen Prototypsequenzen	26

	Seite
2.1.3.4. Symmetrieelemente in der Proto- typsequenz	28
2.2. Analyse einer mittelrepetitiven Sequenz aus Kalbsthymus-DNA	29
2.2.1. Hybridisierungsexperimente mit dem 420 Np - Fragment	29
2.2.2. Hybridisierungsexperimente mit der gesamten Kalbsthymus-DNA	33
2.2.3. Analyse einer Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes	36
2.3. Versuche zur Klonierung von Randsegmenten der 1,706 Satelliten-DNA	39
2.3.1. Fraktionierung von Kalbsthymus-DNA und Vorbehandlung mit Exonuklease III	41
2.3.2. Klonierung einer Kalbsthymus-DNA- Fraktion und Analyse der hybriden Plasmide	43
2.3.3. Identifizierung der klonierten Pst I - Fragmente	45
2.3.4. Charakterisierung der Plasmide mit 1,711 b Satelliten-DNA	50
2.3.5. Erklärung der Ergebnisse der Klonie- rungsexperimente	55

	Seite
3. Diskussion	56
3.1. Struktur und Evolution der 1,706 Satelliten-DNA	56
3.1.1. Amplifikationsprozesse bei der Entstehung der 1,706 Satelliten-DNA	57
3.1.2. Deletionen auf verschiedenen Stufen des Entstehungsprozesses	62
3.1.3. Vergleich mit der 5S rDNA aus <i>Xenopus laevis</i>	63
3.2. Zuordnung des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes	64
3.2.1. Beziehung des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes zur mittlerepetitiven DNA .	64
3.2.2. Vergleich mit der Sequenz der U1 - RNA aus Hepatoma-Zellen	65
3.3. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Kalbsthymus-Satelliten-DNAs	68
3.3.1. Vergleich der 1,720 mit der 1,706 Satelliten-DNA	68
3.3.2. Vergleich der 1,711 a, 1,711 b, 1,715 und 1,706 Satelliten-DNAs	69
3.3.3. Der komplexe Aufbau repetitiver Sequenzen in Kalbsthymus-DNA	69

	Seite
4. Materialien und Methoden	71
4.1. Desoxyribonukleinsäuren	71
4.1.1. Präparation von Plasmid-DNA	71
4.1.2. Präparation von Satelliten-DNA	73
4.2. Restriktionsnukleasen und andere Enzyme ..	73
4.3. Gelelektrophorese	74
4.4. Abbau mit Exonuklease III	74
4.5. Isolierung der Kalbsthymus-DNA-Fraktion für die Ligierungsexperimente zur Kon- struktion der Plasmide 01 - 099	75
4.6. Subklonierung des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes	77
4.7. Transformation und Koloniehybridisierung .	77
4.8. Einhaltung der Sicherheitsrichtlinien	78
4.9. Transfer und Hybridisierung nach E.M. Southern	78
4.10. Markierung von DNA durch "Nick Translation"	79
4.11. Sequenzierung	79
4.11.1. Herstellung von $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$	79
4.11.2. Markierung der Fragmente am 5' - Ende	79

	Seite
4.11.3. Sequenzierungsreaktionen nach Maxam und Gilbert	80
4.11.4. Sequenzierung nach Maat und Smith	80
4.11.5. Autoradiogramme	80
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	82
6. Literaturverzeichnis	85
7. Abkürzungsverzeichnis	92
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus allen bisher untersuchten höheren Eukaryonten enthält Sequenzen, welche in zahlreichen Kopien im Genom vorkommen. Durch Renaturierungskinetiken lassen sich Sequenzen, die in weniger als 10^5 Kopien vorkommen, von Sequenzen unterscheiden, die öfter als 10^5 mal wiederholt werden (1). So kann die eukaryontische DNA den Repetitionsfrequenzen verschiedener Sequenzfamilien entsprechend in drei Komponenten unterteilt werden: in mittelrepetitive und hochrepetitive DNA und in DNA, die Sequenzen enthält, welche nur in einer Kopie oder wenige Male im Genom vertreten sind. Die hochrepetitive Komponente läßt sich oft aufgrund ihrer Dichte in Gradienten aus Caesiumsalzen von der übrigen DNA abtrennen (2); man nennt sie dann "Satelliten-DNA". Diese Bezeichnung soll hier auch für hochrepetitive DNA verwendet werden, für die bis heute noch keine Abtrennung durch Gradientenzentrifugation möglich ist.

Behandelt man eukaryontische DNA mit Restriktionsnukleasen, die diese sequenzspezifisch in viele Bruchstücke zerlegen, kann man die entstehenden Fragmente durch Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend auftrennen. Dabei erhält man eine kontinuierliche Verteilung der Restriktionsfragmente. Prominente Banden in dieser Verteilung entsprechen Fragmenten, die aus hochrepetitiven Sequenzen hervorgehen (3). Die Analyse mit Restriktionsnukleasen (4-6) - neben den Untersuchungen durch Renaturierungskinetiken und Gradientenzentrifugation - trug wesentlich dazu bei, Satelliten-DNAs in ihrer Struktur aufzuklären.

Eine Satelliten-DNA ist häufig aus einfachen Sequenzmotiven mit einer Länge von 2 - 20 Nukleotidpaaren aufgebaut (7-9), die vielfach variiert werden. Sie kann jedoch auch aus längeren repetitiven Einheiten (6,10) bestehen und eine komplexe Sequenzstruktur (11) aufweisen. Bisher wurden außer den einfachen Sequenzmotiven (7-9, 12) nur wenige Sequenzen komplexer Satelliten-DNAs ermittelt (13-18). Für die Sequenzierung mit den zur Verfügung stehenden neuen Methoden (Übersicht in Referenz 19) kann man einzelne Restriktionsfragmente benutzen, die mit Hilfe der Klonierungstechnik in ausreichender Menge gewonnen werden können (11).

Hochrepetitive DNA ist hauptsächlich im zentromeren Heterochromatin (20,21) lokalisiert, obwohl sie auch in mehreren Blöcken in anderen Positionen und an den Chromosomenenden gefunden wird. Die verschiedenen hochrepetitiven Komponenten können in charakteristischer Weise auf den einzelnen Chromosomen eines Chromosomensatzes angeordnet sein (22). Eine Sequenz kann zum Beispiel nur auf dem Y-Chromosom vorkommen (23) oder sie kann auf die Keimbahn (24) beschränkt bleiben. Die einzelnen Varianten der Grundsequenz einer Satelliten-DNA müssen auch nicht gleichmäßig über das Genom verteilt sein (25).

Die Funktion der hochrepetitiven DNA-Komponenten blieb bis heute ungeklärt (26,27) und bot Anlaß für zahlreiche Spekulationen. Die Vermutungen reichten von ihrer Beteiligung an der Chromosomenpaarung in der Meiose (28) oder an Umstrukturierungen im Chromosom (29) und an mitotischen Rekombinationsprozessen (30) bis zur Hypothese, daß Variabilität in Satelliten-DNA-Sequenzen zur Entstehung von Speziesbarrieren (9) beiträgt. Die verschiedenen Hypothesen konnten experi-

mentell nicht eindeutig bewiesen oder widerlegt werden. Diese Situation veranlaßte kürzlich zwei Arbeitsgruppen (31,32) zu der Forderung, umzudenken und auch in Betracht zu ziehen, daß gewisse DNA-Sequenzen keinerlei Funktion haben müßten. Die "selfish DNA", zu der sie unter anderem auch Satelliten-DNA zählen, wird nach ihrer Ansicht durch spezifische Mechanismen innerhalb des Genoms amplifiziert und in verschiedene Positionen transloziert. Der Expansion dieser Sequenzen wird nur durch die metabolische "Mehrarbeit" für ihre Replikation Grenzen gesetzt. Nach der Meinung von Orgel und Crick (32) ist der selektive Nachteil eines geringen Anteils solcher Sequenzen am Gesamtgenom aber derart gering, daß die "selfish DNA" sich rapide in der Gesamtpopulation verbreiten würde und sie, wenn überhaupt, dann nur innerhalb eines sehr langen Zeitraumes eliminiert werden könnte. Bis vor kurzem schien es, als ob Satelliten-DNA-Sequenzen nicht transkribiert würden (33,34). Eine Arbeitsgruppe (35) konnte jetzt aber die Transkription einer DNA-Fraktion, die wahrscheinlich Satelliten-DNA ist, in Triturus-Oozyten nachweisen.

Ebenso wie für die Funktion wurden auch verschiedene Hypothesen für die Entstehungsweise der Satelliten-DNA entworfen. Die Modelle für Mechanismen zur Amplifikation bestimmter Sequenzen reichen von der saltatorischen Replikation (1) über das nicht reziproke Crossover (36) bis zu einer Beteiligung der Nukleosomen an spezifischen Replikationsschleifen (37). Aus einer Vielzahl von Sequenzen, die in allen Arten einen Grundstock für repetitive Sequenzen bilden, sollen nach der "Library-Hypothese" von Fry und Salser (9) bestimmte Sequenzen in verschiedenem Ausmaß amplifiziert worden sein.

Mehrere ähnliche Satelliten-DNAs in der gleichen Art oder in verwandten Arten wurden bei *Drosophila* (38), verschiedenen Hominiden (39), der Känguruhratte (9), der Maus (40), der Ratte (27), zwei Roggenarten (41) und dem Rind (42-45) untersucht. Aus diesen Strukturvergleichen erhofft man sich, Rückschlüsse auf die Evolution der hochrepetitiven DNAs ziehen zu können. Hierfür scheint das Rindergenom besonders geeignet zu sein, da es zu einem großen Teil (27%,44) aus verschiedenen hochrepetitiven Komponenten besteht.

Die Satelliten-DNA des Rindes mit der Schwimmdichte $1,706 \text{ g/cm}^3$ im Caesiumchloriddichtegradienten, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, zeigt einen besonders komplexen Aufbau, der durch Restriktionskartierung bis zu einem gewissen Grade aufgelöst werden konnte (45): Die DNA weist verschiedene, sich überlagernde repetitive Einheiten einer Länge von 11, 22 und 2350 Nukleotidpaaren auf. Bei Spaltung mit der Restriktionsnuklease *Sau 3A I* lassen sich 86% der Satelliten-DNA in Fragmente einer Multimerreihe zerlegen, die sich durchschnittlich um jeweils 11,4 Nukleotidpaare unterscheiden. 14% der Satelliten-DNA ergibt bei dieser Restriktionsspaltung Fragmente einer durchschnittlichen Länge von 250 Nukleotidpaaren, von denen keine Multimere existieren. Bei einer Spaltung mit der Restriktionsnuklease *Alu I* erhält man dagegen eine Fragmentreihe, die einer Periodizität von 22-23 Nukleotidpaaren gerecht wird.

Die nach diesen Daten sicherlich interessante Struktur der 1,706 Satelliten-DNA sollte in der vorliegenden Arbeit durch Sequenzierung klonierter und nicht klonierter Fragmente aufgeklärt werden. Die Klonierung einiger Restrik-

tionsfragmente dieser Satelliten-DNA erfolgte bereits in der eigenen Diplomarbeit (46). Modelle für die Evolution der Satelliten-DNA sollten entworfen werden. Zusätzlich war beabsichtigt, ihre Beziehung zu anderen Satelliten-DNAs und zum nicht repetitiven Anteil in Rindergenom zu untersuchen.

2. ERGEBNISSE

2.1. Aufbau der 1,706 Satelliten-DNA aus Kalbsthymus

In dieser Arbeit werden die Satelliten-DNAs aus Kalbsthymus entsprechend ihrer Schwimmdichte in Caesiumchlorid-Gradienten bezeichnet. So hat die 1,706 Satelliten-DNA in Caesiumchlorid eine Dichte von $1,706 \text{ g/cm}^3$. Diese Nomenklatur stimmt mit den Bezeichnungen in Referenz 44 überein.

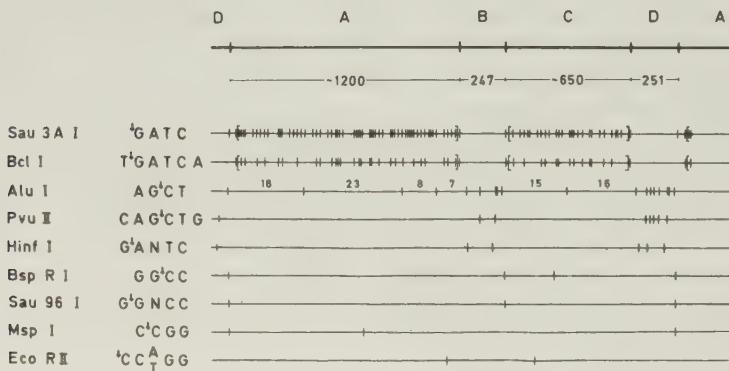


Abb. 1: Die Restriktionskarte der 1,706 Satelliten-DNA. Die Aufteilung der großen repetitiven Einheit der 1,706 Satelliten-DNA in vier Segmente (A-D) und deren Länge in Np ist zusammen mit der häufigsten Position der Spaltstellen verschiedener Restriktionsnukleasen dargestellt. Die Lage der Spaltstellen für Sau 3A I und Bcl I in den Sau-Segmenten (innerhalb der Klammern) wurde nicht im einzelnen festgelegt; die Spaltstellen sind ihrer Häufigkeit

entsprechend eingezeichnet. Die Größen der Alu I - Fragmente sind als Vielfache der Größe der repetitiven Einheit (22,3 Np) angegeben. Neben den Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen sind ihre Erkennungssequenzen aufgeführt.

Aufgrund von Spaltungen mit Restriktionsnukleasen war für die 1,706 Satelliten-DNA folgender Aufbau bekannt: Sie setzt sich aus großen repetitiven Einheiten mit einer Länge von ungefähr 2350 Np zusammen (45). Diese Einheit kann in Segmente unterteilt werden, die häufig von der Restriktionsnuklease Sau 3A I und nicht von Pvu II gespalten werden, und in Segmente, die mehrere Pvu II - aber keine Sau 3A I - Spaltstellen tragen. Die Unterteilung in Sau - (A, C) und in Pvu - (B, D) Segmente ist aus der Restriktionskarte in Abbildung 1 ersichtlich. Die Positionen der Spaltstellen ergeben sich aus Restriktionsspaltungen (R.E. Streeck) und der Sequenz (2.1.3.).

2.1.1. Die Sequenzierstrategie für die Analyse der 1,706 Satelliten-DNA _ _ _ _ _

Plasmide, die Fragmente aus den verschiedenen Segmenten (Abb. 1) enthalten, sowie nicht klonierte Restriktionsfragmente aus den entsprechenden Bereichen wurden zur Sequenzanalyse der 1,706 Satelliten-DNA benutzt.

Plasmide mit 1,706 Satelliten-DNA wurden durch Insertion von Sau 3A I - Partialfragmenten (Plasmide 3691, 3688, Ref. 46) aus gereinigter Satelliten-DNA oder aus isolierten Sau 3A I - (Plasmide 22, 23, 42, 46, 101, 162, 175, 176) oder Bcl I - (Plasmid 2801) Fragmenten in die Bam HI -

Spaltstelle des Plasmids pBR 322 konstruiert (4.1.1. ,
Tabelle 1).

Das Plasmid pBR 322 enthält Sequenzen, die für die Resistenz der plasmidtragenden Zellen gegen Ampicillin und Tetracyclin codieren. Der Einbau einer fremden DNA in die Bam HI - Spaltstelle des Plasmids führt zum Verlust der Tetracyclin-Resistenz, ein Einbau in die Pst I - Spaltstelle zum Verlust der Ampicillin-Resistenz.

Die hybriden Plasmide wurden teilweise mit Hilfe von Restriktionsnukleasen kartiert. In Abbildung 2 ist als Beispiel das Bandenmuster einer Taq I - Spaltung des Plasmids 3691 wiedergegeben. Durch den Einbau eines 66 Np langen Fragmentes in die Bam HI - Spaltstelle von pBR 322 vergrößert sich das 312 Np große Taq I - Fragment auf 378 Np.

Die Strategie für die Sequenzierung der inserierten Satelliten-DNA-Fragmente ergab sich aus der Analyse der Plasmide 3688, 3691 und pBR 322. Zu Beginn der Sequenzanalyse waren Restriktionsspaltstellen oder die Sequenz in unmittelbarer Umgebung der Bam HI - Spaltstelle von pBR 322 unbekannt. Die Sequenz von mehr als 100 Np beiderseits der Bam HI - Spaltstelle wurde bestimmt, und diese war mit der später von J.G. Sutcliffe ermittelten Sequenz identisch (J.G. Sutcliffe, persönliche Mitteilung). Hierdurch wurde eine Hpa II - Spaltstelle, 12 Np von der Bam HI - Spaltstelle entfernt, gefunden, die es ermöglichte, von Plasmidvektor-Sequenzen aus über die Grenze zur inserierten Satelliten-DNA zu sequenzieren.

Dieses Vorgehen war notwendig, weil die hybriden Plasmide durch die Verknüpfung von Sau 3A I - Einzelstrangenden

($\begin{smallmatrix} \text{NGATC} \\ \text{N} \end{smallmatrix}$, 47) oder Bcl I - Einzelstrangenden ($\begin{smallmatrix} \text{TGATC} \\ \text{A} \end{smallmatrix}$, 48) mit Bam HI - Einzelstrangenden ($\begin{smallmatrix} \text{CTAGG} \\ \text{C} \end{smallmatrix}$, 49) konstruiert worden waren. Eine Spaltung dieser Plasmide mit Bam HI oder Bcl I, um die inserierten Sau 3A I - Partialfragmente oder die Bcl I - Fragmente zu isolieren, ist nicht immer möglich, da die Erkennungssequenz für Bam HI ($\begin{smallmatrix} \text{GGATCC} \\ \text{CCTAGG} \end{smallmatrix}$) nicht mit den erwarteten Sequenzen an den Ligationen ($\begin{smallmatrix} \text{N}_1 \text{GATC} \text{N}_2 \\ \text{N}_1 \text{CTAG} \text{N}_2 \end{smallmatrix}$ oder $\begin{smallmatrix} \text{TGATCC} \\ \text{ACTAGG} \end{smallmatrix}$) übereinstimmen muß.

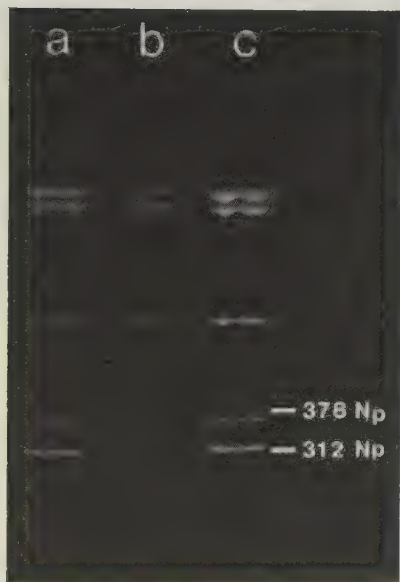


Abb. 2: Taq I - Spaltungen der Plasmide 3691 und pBR 322

Die Plasmid-DNAs wurden mit Taq I gespalten (4.2.) und auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt (4.3.):

a) pBR 322 b) 3691 c) 3691 und pBR 322. Durch Einbau eines 66 Np großen Sau 3A I - Fragmentes in die Bam HI - Spaltstelle von pBR 322 vergrößert sich das entsprechende Taq I - Fragment (312 Np) auf 378 Np.

Deshalb wurden für die Sequenzanalyse Hpa II - Fragmente aus Polyacrylamidgelen isoliert (4.3.), die sich von denen einer Hpa II - Spaltung des Plasmids pBR 322 durch Einbau von Satelliten-DNA unterschieden. Ein Beispiel für eine Spaltung eines hybriden Plasmids (3688) mit Hpa II ist in Abbildung 3 dargestellt. Die zusätzlichen Hpa II - Fragmente lassen sich durch Gelelektrophorese gut von den übrigen Fragmenten abtrennen.



Abb. 3: Spaltungen von pBR 322 und Plasmid 3688 mit Hpa II

Die Hpa II - Spaltungen (4.2.) wurden auf einem 2%-igen Agarosegel analysiert (4.3.):

a) pBR 322 b) 3688

Die Pfeile kennzeichnen die im Plasmid 3688 zusätzlich auftretenden Hpa II - Fragmente.

Für die Sequenzanalyse nicht klonierter Satelliten-DNA-Fragmente wurden isolierte Bcl I - und Bsp RI - Fragmente

verwendet. Nach Spaltung der gereinigten 1,706 Satelliten-DNA (4.1.2.) mit Bcl I und Auftrennung der Spaltprodukte auf 4% Polyacrylamidgelen (4.3.) konnten die 286 Np großen Fragmente, die die Pvu - Segmente D (Abb. 1) enthalten, und die 247 Np großen Fragmente, die den Pvu - Segmenten B (Abb. 1) entsprechen, isoliert werden. Mit den isolierten, circa 635 Np großen Fragmenten einer Bsp RI - Spaltung (45) ergab sich die Möglichkeit, einen Teil der Sau - Segmente C (Abb. 1) zu sequenzieren.

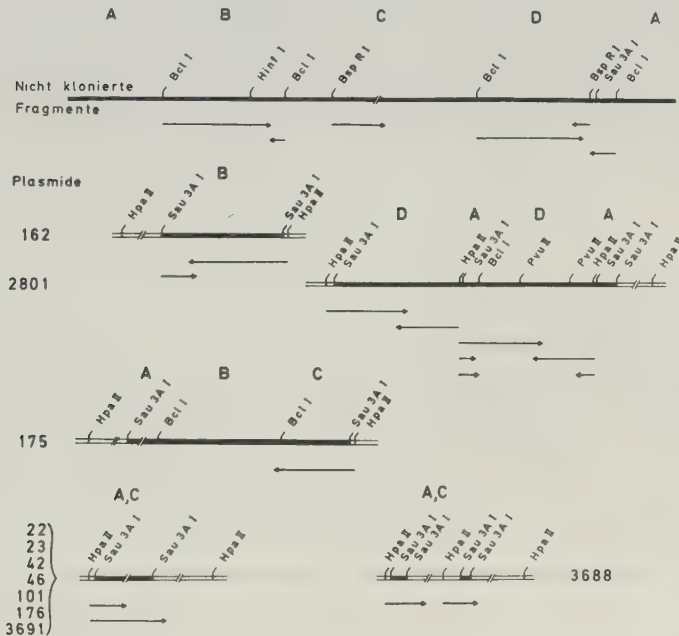


Abb. 4: Sequenzierstrategie und Zuordnung der hybriden Plasmide

Die Lage von Restriktionsspaltstellen in nicht klonierter Satelliten-DNA und in einzelnen Plasmiden ist angegeben.

Die Pfeile kennzeichnen die Richtung ($5' \rightarrow 3'$) und die Länge der sequenzierten DNA-Stränge. Klonierte Fragmente aus den hybriden Plasmiden 162, 175 und 2801 wurden der Restriktionskarte (Abb. 1) zugeordnet. Plasmid 2801 enthält zwei 286 Np - Bcl I - Fragmente, die jeweils dem Segment D und dem Übergang zu Segment A entsprechen. Die anderen hybriden Plasmide enthielten Fragmente aus den Sau - Segmenten (A, C); für sie ist eine genaue Zuordnung zur Restriktionskarte der Satelliten-DNA nicht möglich. Satelliten-DNA ist in Form ausgefüllter Balken dargestellt; Plasmid-DNA und ein 420 Np - Fragment in Plasmid 3688 (2.2.) sind als offene Balken gezeichnet.

In Abbildung 4 ist die Sequenzierstrategie der klonierten und nicht klonierten Satelliten-DNA-Fragmente in einer Übersicht zusammengestellt. Hieraus läßt sich auch die Zuordnung der klonierten Fragmente in verschiedenen hybriden Plasmiden zur großen repetitiven Einheit ersehen.

2.1.2. Sequenzierung der isolierten Restriktionsfragmente

Die Restriktionsfragmente wurden der unter 2.1.1. erläuterten Sequenzierstrategie entsprechend isoliert (4.3.) und mit ^{32}P markiert (4.11.2.). Anschließend wurden sie mit verschiedenen Restriktionsnukleasen nachgespalten, um Fragmente zu erhalten, die nur an einem $5'$ - Ende mit ^{32}P markiert waren. Es müssen also zweimal Restriktionsnukleasen verwendet werden, um geeignete Fragmente für die Sequenzierreaktionen zu erhalten. Zusätzlich brauchen diese Fragmente bei nicht klonierter DNA nicht sequenzeinheitlich zu sein und können sich in ihrer Modifikation von klonierter DNA unterscheiden. Die Besonderheiten in den Spaltungen mit Restriktionsnukleasen und bei nicht klonierter DNA finden

ihren Ausdruck in spezifischen Effekten der Sequenzgele. So wurde eine unterschiedliche Spaltung von Restriktionsnukleasen an Fragmentenden, durch Sau 3A I verursachte Einzelstrangbrüche und ein bestimmtes Methylierungsmuster nicht klonierter DNA gefunden.

2.1.2.1. Spaltung von Restriktionsnukleasen an Fragmentenden

Im Rahmen der Sequenzierstrategie erschien es in zwei Fällen notwendig, an beiden Fragmentenden markierte DNA mit einer Restriktionsnuklease nachzuspalten, deren Erkennungssequenz unmittelbar an einem Fragmentende lokalisiert war. Als Beweis einer vollständigen Spaltung wurde die eindeutige Interpretierbarkeit der Autoradiogramme von Sequenzgelen gewertet, die mit dem nachgespaltenen, isolierten Fragment erhalten wurden. Markierung an beiden 5' - Enden eines DNA-Fragmentes führt zu nicht auswertbaren Sequenzgelen, da sich zwei Sequenzen überlagern.

Die Sequenz 5'---AGGCC[↓]CGGATCA---3', die an einer Stelle im Plasmid 2801 vorkommt, kann als Substrat für vier verschiedene Restriktionsnukleasen dienen, nämlich für Sau 96 I (G[↓]GNCC, 50), Bsp RI (GG[↓]CC, 51), Hpa II (C[↓]CGG, 52) und Sau 3A I (GATC[↓], 47). Bei Spaltung mit Hpa II erhält man somit zwei Fragmente, von denen das eine an einem Ende eine Bsp RI -, das andere eine Sau 3A I - Erkennungssequenz trägt. Während sich nach der Isolierung der Hpa II - Fragmente von Plasmid 2801 die terminale Sequenz

$$\begin{pmatrix} 5' \text{---GG}^{\downarrow} \text{CC(OH)} \text{ } 3' \\ 3' \text{---CC}^{\uparrow} \text{GGGC(}^{32}\text{P)} 5' \end{pmatrix}$$

komplett mit Bsp RI spalten ließ, war die Endsequenz

$$\begin{pmatrix} 5' \text{(}^{32}\text{P)} \text{CG}^{\downarrow} \text{GATC ---} 3' \\ 3' \text{(OH) CTAG}^{\uparrow} \text{---} 5' \end{pmatrix}$$

gegen Spaltung mit Sau 3A I resistent. Obwohl in beiden Fällen die komplette

Erkennungssequenz beider Nukleasen erhalten geblieben ist, scheint für Sau 3A I diese Sequenz nicht für eine Spaltung auszureichen. Vielleicht spiegelt sich in diesem unterschiedlichen Verhalten beider Restriktionsnukleasen die besondere Struktur von Bsp RI wieder. Diese Restriktionsnuklease ist im Unterschied zu allen anderen Restriktionsnukleasen bekannter Struktur nur in der monomeren Form aktiv (53).

2.1.2.2. Einführung von Einzelstrangbrüchen durch die Restriktionsnuklease Sau 3A I

Die Nachspaltung isolierter, mit ^{32}P markierter Fragmente mit einem sechs- bis zehnfachen Überschuß an Sau 3A I in kleinem Volumen ($10\mu\text{l}$) führte zu einem besonderen Effekt in den Sequenzgelen dieser Fragmente. Die Autoradiogramme dieser Gele wiesen an bestimmten Positionen Banden in allen basenspezifischen Bahnen auf. Das wies darauf hin, daß spezifische Einzelstrangbrüche in den isolierten, doppelsträngigen DNA-Fragmenten existierten. Eine andere Sequenziermethode, die Methode nach Maat und Smith (54), benützt Einzelstrangbrüche als Substrat für Polymerase I (4.11.4.). Bei dieser Methode werden die Einzelstrangbrüche "überlesen". Dies konnte durch Auftragung der Reaktionsprodukte beider Sequenziermethoden auf das gleiche Sequenzgel bestätigt werden (Abbildung 5). Die Einzelstrangbrüche traten nur an bestimmten Sequenzen auf, die der Erkennungssequenz GATC von Sau 3A I ähnlich sind, nämlich an den Sequenzen GAGC und CATC. Bei den Sequenzen GCTC, GTTC, GAAC und GATT traten keine Einzelstrangbrüche auf. Ob diese Einzelstrangbrüche aufgrund des hohen Enzym-DNA Verhältnisses oder des Glycerinanteiles von mehr als 10% in dem Inkubationsansatz

auftraten, wurde nicht weiter untersucht. Einzelstrangaktivität einer Restriktionsnuklease bei Sequenzen, die der Erkennungssequenz ähnlich sind, ist bereits für Eco RI beschrieben worden (55).

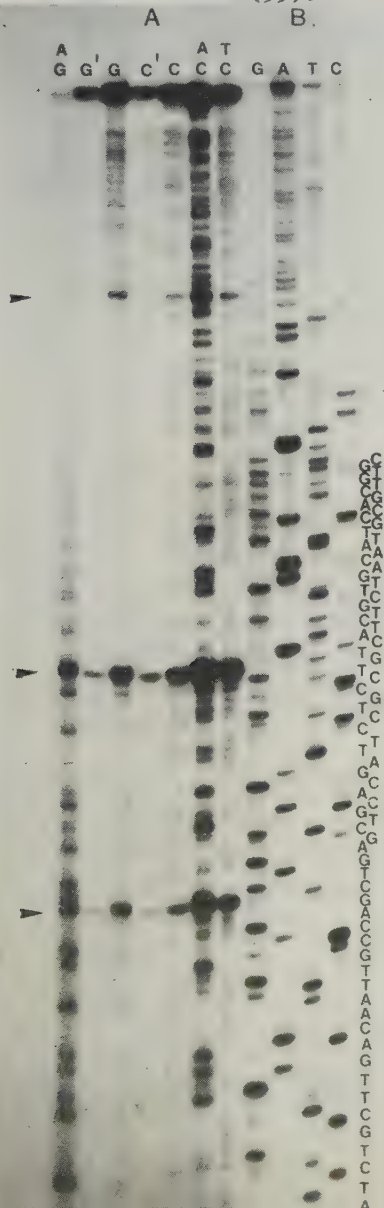


Abb. 5: Demonstration der durch Sau 3A I verursachten Einzelstrangbrüche

Ein 259 Np großes Hpa II - Fragment aus Plasmid 2801 (Abb.4) wurde mit 32 P an den 5' - Enden markiert (4.11.2.) und mit einem Überschuß der Restriktionsnuklease Sau 3A I (circa 100 µg/ml DNA mit 600 Einheiten/ml Sau 3A I) inkubiert (4.2.). Das isolierte (4.3.) 249 Np große Sau 3A I-Hpa II - Fragment wurde den Sequenzierreaktionen von Maxam und Gilbert (A, 4.11.3.) und der Sequenziermethode von Maat und Smith (B, 4.11.4.) unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 8%-igen Polyacrylamidgel (4.11.3.) aufgetrennt. Die Pfeile kennzeichnen im Autoradiogramm (4.11.5.) die Positionen der durch Sau 3A I verursachten Einzelstrangbrüche, die bei der Methode von Maat und Smith "überlesen" werden.

2.1.2.3. Restriktionsfragmente von nicht klonierter eukaryontischer DNA

Bei der Sequenzierung nicht klonierter Fragmente bestimmter Länge muß man berücksichtigen, daß die isolierten Fragmente zwar gleich groß sind, aber nicht sequenzeinheitlich zu sein brauchen. Das Ausmaß ihrer Homologie bestimmt die Interpretierbarkeit der Sequenzgele. Das Bandenmuster im Autoradiogramm repräsentiert die Sequenz der häufigsten Nukleotide je Position in den DNA-Fragmenten. Ist eine bestimmte Position in 10% der Fragmente mit einem alternativen Nukleotid besetzt, hängt es von der Qualität und dem Typ der benützten Abbaureaktionen ab, ob dieser Austausch in den Autoradiogrammen in Form minorer Banden zum Ausdruck kommt. Bei Verwendung von fünf basenspezifischen Reaktionen, nämlich für G, A+G, C, C+T und A+C spiegelt sich nur der teilweise Ersatz von Cytosin durch Thymin nicht in zusätzlichen Banden in den entsprechenden Autoradiogrammen wieder.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen Autoradiogramme von Sequenzgelen nicht klonierter 1,706 Satelliten-DNA-Fragmente. Besonders durch die lange Exposition des Autoradiogrammes in Abbildung 7 wird deutlich, daß die Sequenzhomologie dieser Fragmente ausgeprägt sein muß, da keine minoren Banden auftreten.

Eukaryontische und prokaryontische DNA sind teilweise modifiziert; in beiden DNAs findet man unter anderem 5-Methylcytosin (m ^5C oder C^*) (56). Während diese modifizierte Base in DNA aus Tierzellen fast nur in der Sequenz CpG

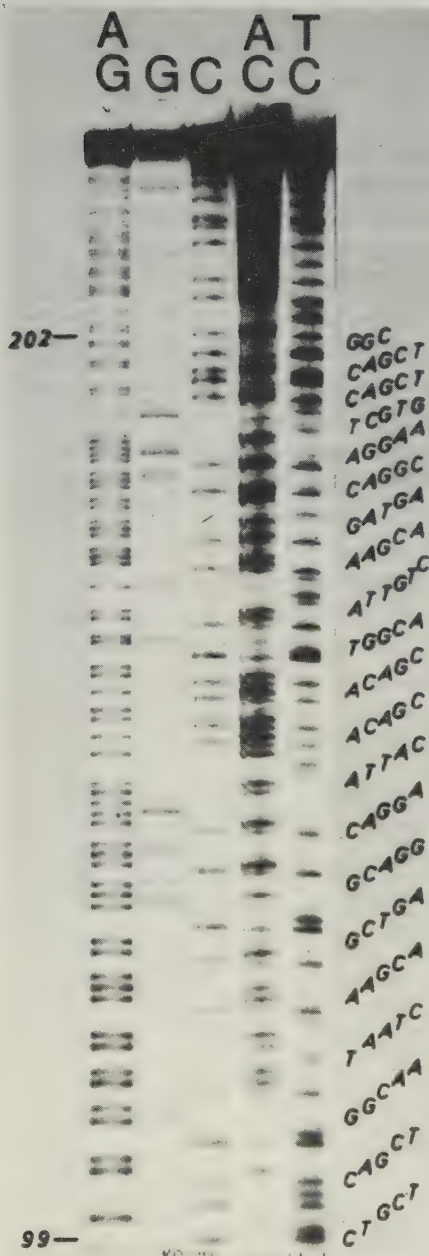


Abb. 6: Autoradiogramm des Sequenzgels eines nicht klonierten Fragmentes

Die 286 Np großen Bcl I - Fragmente aus 1,706 Satelliten-DNA, welche die Pvu-Segmente D und den Anfang der Sau-Segmente A enthalten (2.1.1.), wurden nach Markierung mit 32 P (4.11.2) mit Bsp RI nachgespalten. Die isolierten 247 Np großen Bcl I - Bsp RI - Fragmente wurden nach der Methode von Maxam und Gilbert (4.11.3.) sequenziert. Das Autoradiogramm eines 8%-igen Polyacrylamidgels (4.11.5.) ermöglicht die Festlegung der Sequenz von Position 99 bis 202, wenn als Position 1 das 32 P markierte 5' - Ende gewählt wird.



Abb. 7: Methylierung in CpG und geringe Sequenzheterogenität in einem nicht klonierten Fragment

Die 39 Np großen Fragmente, die als weiteres Produkt der in der Legende zu Abb. 6 beschriebenen Spaltung entstanden, wurden den Abbaureaktionen nach Maxam und Gilbert (4.11.3.) unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 20%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (4.11.3.). Das Autoradiogramm zeigt auch nach überlanger Exposition keine minoren Banden. C/mC weist auf das Vorhandensein einer Mischung von C und mC hin.

vorkommt (57-59), erscheint m^5C in prokaryontischer DNA nur in den Sequenzen CC^*AGG und CC^*TGG (60).

5 - Methylcytosin in einer Basenabfolge ist durch eine Lücke im Bandenmuster der Autoradiogramme von Sequenzgelen zu erkennen (61,62). Sind nicht alle Fragmente an dieser Position methyliert, zeigen die entsprechenden Banden in der C - und C+T - Bahn des Autoradiogramms nur eine geringere Schwärzung als andere C - Banden. Aus Abbildung 7 sieht man, daß nur ein kleiner Anteil aller nicht klonierten Fragmente in CpG nicht methyliert ist. Diese Situation wurde beim Sequenzieren der nicht klonierten Fragmente in fast allen Fällen, bei denen CpG in der Sequenz vorkam, gefunden. Nur die Sequenz $AGGCCC^*GG$ im Pvu - Segment D enthielt in allen Fragmenten m^5C . Methylierung in dieser Position führt dazu, daß die Sequenz CC^*GG nicht mehr durch Hpa II, sondern nur noch durch Msp I gespalten werden kann (63). Die Methylierung aller Pvu - Segmente D in der Sequenz $AGGCCC^*GG$ konnte deshalb durch die Resistenz der nicht klonierten DNA gegenüber Spaltung mit Hpa II und ihre Spaltbarkeit mit Msp I bestätigt werden (R.E. Streeck). Für die Restriktionsnuklease Sau 96 I mit der Erkennungssequenz $\begin{array}{l} -GG \text{ NCC-} \\ -CC'NGG- \end{array}$ (50) scheint die Methylierung nur eines Cytosins innerhalb der Sequenz $\begin{array}{l} -A \text{ GGCCC}^* \text{ G}^*G- \\ -T \text{ CCGGG} \text{ C}^*C- \end{array}$ für die Resistenz dieser Basenabfolge gegenüber Verdauung mit Sau 96 I ausreichend zu sein.

2.1.3. Sequenz der 1,706 Satelliten-DNA

2200 Nukleotide klonierter und nicht klonierter Satelliten-DNA wurden sequenziert. 25% dieser Sequenzen wurde mit einer zweiten Sequenziermethode, der Methode nach Maat und Smith (4.11.4.) bestätigt. Die Sequenzen sind in den Abbildungen 8 - 10 zusammengefaßt.

2.1.3.1. Sequenzvergleich klonierter und nicht klonierter DNA

Die Autoradiogramme der Sequenzgele nicht klonierter Satelliten-DNA-Fragmente sprechen für eine Sequenzheterogenität dieser Fragmente, die kleiner als 10% ist (2.1.2.3.). Vergleicht man die Sequenz klonierter Fragmente in verschiedenen hybriden Plasmiden, die aus der gleichen Region der Restriktionskarte der 1,706 Satelliten-DNA stammen, miteinander und mit der Basenabfolge der nicht klonierten Fragmente, erhält man weitere Aufschlüsse über das Ausmaß der Sequenzhomologien.

Die Sequenz des Pvu - Segmentes D wurde von drei verschiedenen Fragmenten ermittelt. Die beiden klonierten Fragmente und das nicht klonierte Fragment waren in ihrer Sequenz identisch (Abb. 10A). Zwischen dem Pvu - Segment B und dem entsprechenden klonierten Fragment wurden nur drei Basenaustausche beobachtet (Abb. 10B). Auch die dem Pvu - Segment D unmittelbar benachbarte Sequenz ist in klonierter und nicht klonierter DNA identisch; sie ist einmal in Abbildung 8 als Sequenz des Plasmids 2801 dargestellt.

PLASMID	1	12	23
22	5'	<u>GATC</u> ATGCACT	3'
		GTTTACGTTGACT	
23	5'	<u>GATC</u> ATACACT	
		GCTCACGTAACTGATGATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGGCT ATCATGCACT	3'
42	5'	<u>GATC</u> ATTCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGACTGACCATGCACG	
		<u>GATC</u> ACGTGACT	3'
46	5'	<u>GATC</u> CTGCACT	
		<u>GATC</u> ACATGGCTCATCAGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGAGTAATCATGCACT	
		CTTACGTGCAT <u>GATC</u> ATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGGCT ATCATGCACT	
		GCTCACGTGGCT	3'
3691	5'	<u>GATC</u> ACGTGACT TAATGGCGCT	
		<u>GATC</u> ACGTGGCT ATCATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGGAT ATCATGCACT	3'
3688	5'	<u>GATC</u> ATGCACT	
		GATACCGTGACTGAGCATGGACG	
		<u>GATC</u> ACGTGGCT ATCCTGCACT	3'
176	5'	<u>GATC</u> ACGTCTAT ATCATGCACT	
		<u>GATC</u> ACATGACTGCCCATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGAT	3'
101	5'	 <u>GATC</u> ATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGGC TATCATGCACT	
		GCTCACGTGGCT <u>GATC</u> ATGCAAT	
		<u>GATC</u> ACGTAGCT ACCATGCACT	
		GGTCACGTGACT <u>GATC</u> GTGCACT	
		GCTCAGGTAATT <u>GATC</u> ATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGACT	3'
175	5'	... Pvu SEGMENT B ...CAGGCCCT	
		<u>GATC</u> ACGTGACTGAGCATGCACT	
		<u>GATC</u> ACGTGGAT <u>GATC</u> ACACACC	
		TATCACGTGACT <u>GATC</u> ATGCACT	
		<u>GATC</u> ATGTGACT <u>GATC</u> ATGCACT	
		GATGACGTGGCTATTAATGCACT	
		<u>GATC</u> ACTTGGCTGGACATACACT	3'
2801	5'	... Pvu SEGMENT D ...CAGGCCCG	
		<u>GATC</u> ACGTGACTGAGCATGCACT	
		GTTTACGTGGCT	3'
		GATCACGTGACTGATCATGCACT	

Abb. 8: Sequenzen der klonierten Fragmente aus Sau - Segmenten

Die Sequenzen sind in 23 Np Einheiten geordnet. Vor jeder Sequenz ist das hybride Plasmid angegeben, aus dem die klonierten Satelliten-DNA-Fragmente stammen. Für Plasmid 175 und 2801 ist der Übergang zur Sequenz der Pvu - Segmente dargestellt. Die Sequenz, die bei Plasmid 2801 an Segment D anschließt, wurde auch für das nicht klonierte Fragment gefunden. Sau 3A I - Spaltstellen sind unterstrichen. Die Prototypsequenz (2.1.3.2.) einer 23 Np Einheit ist unterhalb der Sequenzen der klonierten Fragmente aufgeführt.

```

      1                12                23
5'      G G C C C G T C A T G C A G T
      G A T C A C G T G G C T   A T C A T G C A C T
      A C T C A C T T G G C T G A T C A T G C A A T
      G A T C A T G T A G C T   A C C A T G T A C A
      G G T C A T G T G A A T G A T C A T A C A C C
      C A T C A G G T G A C T G A T C A T G C A C T
      G A T C A C G T G G C T   A T C A T G C A C T
      G A T C A C G A G A C T G A T C A T G C A C T 3'

```

Abb. 9: Sequenz
eines nicht klonier-
ten Fragmentes aus
Sau - Segment C

Die Sequenz wurde,
wie aus Abb. 4 er-
sichtlich, aus
nicht klonierten
Bsp RI - Fragmenten
ermittelt. Die
Darstellung der
Sequenz entspricht
der in Abb. 8.

Die Teilsequenz des Sau - Segmentes C ist den Sequenzen
klonierter Sau 3A I - Partialfragmente homolog (Abb. 8
und 9).

Im Rindergenom existieren ungefähr 50 000 Kopien der gro-
ßen repetitiven Einheit, wenn man den relativen Anteil der
1,706 Satelliten-DNA an der gesamten DNA der Berechnung
zugrunde legt. Somit liegt auch das Pvu - Segment D in
50 000 Kopien vor. Durch die Klonierung wurde hieraus eine
zufällige Auswahl getroffen. Die zwei sequenzierten Kopien
unterschieden sich in keiner Position von der Sequenz der
nicht klonierten Fragmente, welche die Abfolge der in je-
der Position am häufigsten vertretenen Basen darstellt.
Definiert man die Gesamt-Divergenz einer Sequenz als die
Wahrscheinlichkeit p , mit der jedes Basenpaar ausgetauscht
werden kann (Definition nach E.M. Southern, Ref. 6), so
beträgt die Wahrscheinlichkeit, kein ausgetauschtes Basen-
paar zu enthalten, für eine Sequenz der Länge n :
 $P = (1-p)^n$. Damit mindestens eine von 50 000 Kopien diese

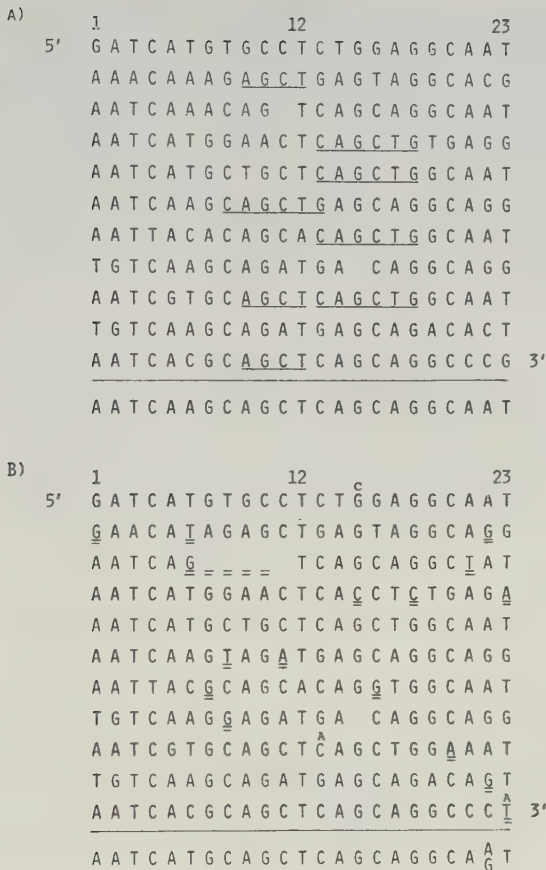


Abb. 10: Sequenzen der klonierten und nicht klonierten Fragmente aus den Pvu - Segmenten
Die Darstellung faßt die Ergebnisse der Sequenzierung klo-

nierter und nicht klonierter Fragmente zusammen. Die Sequenz für Pvu - Segment D (A) wurde in nicht klonierten und zwei klonierten Fragmenten gefunden. Alu I - und Pvu II - Spaltstellen sind unterstrichen. Die Sequenz für Pvu - Segment B (B) weicht in Plasmid 162 an drei Positionen von der Sequenz der nicht klonierten Fragmente ab. Die entsprechenden Nukleotide sind an diesen Positionen über den Nukleotiden angegeben, die für die nicht klonierten Fragmente erhalten wurden. Von Pvu - Segment D abweichende Positionen sind doppelt unterstrichen. Der Darstellung wurde in A und B eine 23 Np Einheit zugrunde gelegt. Unterhalb der Segment - Sequenzen ist jeweils die 23 Np Prototypsequenz (2.1.3.2.) aufgeführt.

Sequenz aufweisen kann, muß nach $1/5 \times 10^4 \leq (1-p)^{251}$
 $p \leq 0,04$ werden. Die Wahrscheinlichkeit, diese eine Kopie im Klonierungsexperiment zweimal zu finden, ist mit $1/(5 \times 10^4)^2$ sehr gering. Diese Abschätzung beweist, daß die Divergenz der Pvu - Segmente erheblich unter 4% liegen muß.

2.1.3.2. Prototypsequenzen der 1,706 Satelliten - DNA

Die Sequenzen der Pvu - und der Sau - Segmente lassen sich derart ordnen, daß aus sich wiederholenden Basenabfolgen Einheiten gebildet werden, in denen definierte Positionen häufig von derselben Base eingenommen werden. Aus diesen repetitiven Einheiten läßt sich eine Prototypsequenz ermitteln, die aus der Sequenz der Basen besteht, mit denen die jeweiligen Positionen in der Einheit am häufigsten besetzt sind. Für eine Einheit mit 23 Positionen ist dies in Abbildung 11 gezeigt; in den Abbildungen 8 - 10 sind alle Sequenzen zu Einheiten mit 23 Positionen geordnet worden. Dabei müssen nicht in jeder einzelnen Einheit

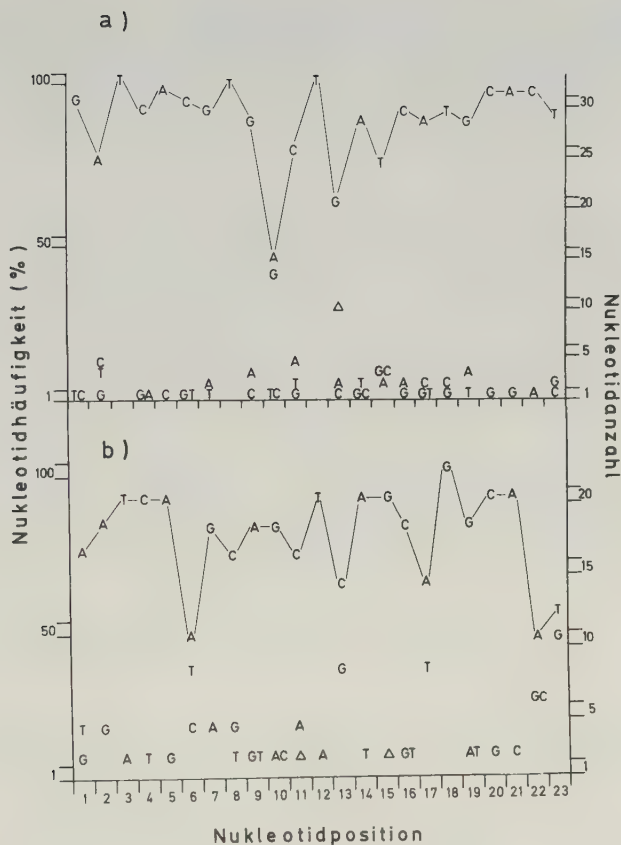


Abb. 11: Ableitung der Prototypsequenz

Die Häufigkeiten für A, G, C und T wurden für jede Position einer 23 Np Einheit bestimmt. Die Häufigkeitsverteilung für die Sau - Segmente (a) basiert auf den

Sequenzen der Abb. 8. Die entsprechende Verteilung für Pvu - Segment D (b) wurde aus den Sequenzen der beiden klonierten Fragmente erhalten (Abb. 10A). Deletionen sind durch Δ gekennzeichnet. Die häufigsten Nukleotide in jeder Position sind durch eine Linie verbunden. Die Sequenz entlang dieser Linie entspricht der Prototypsequenz.

alle Positionen durch eine Base besetzt sein. Trotzdem sollen wegen der einfacheren Benennung diese Einheiten als 23 Np Einheiten mit einer 23 Np Prototypsequenz bezeichnet werden. Vergleicht man die Häufigkeit, mit der Positionen in der Einheit mit von der Prototypsequenz abweichenden Basen besetzt sind in den Pvu - und Sau - Segmenten (Abb. 11), findet man keine besonders "variablen" oder "konstanten" Positionen. Nur die Positionen 10 und 13 der Einheiten für die Sau - Segmente sind auffallend variabel. Hier ist aber nur ein G gegen ein A ausgetauscht bzw. eine Deletion anzunehmen.

2.1.3.3. Unterschiedliche Divergenzen bei verschiedenen Prototypsequenzen

Nach der Definition der Prototypsequenz (2.1.3.2.) stellt auch die Sequenz der nicht klonierten Fragmente eine Prototypsequenz dar. Nur ist dieser Prototypsequenz die größte repetitive Einheit der 1,706 Satelliten-DNA, die 2350 Np Einheit, zugrunde gelegt. Prototypsequenzen lassen sich auf der Basis noch weiterer Einheiten festlegen. Die Gesamt - Divergenz der Segmente kann man, ähnlich wie unter 2.1.3.1. beschrieben, aus dem Verhältnis der Zahl abweichender Positionen zur Anzahl aller untersuchten

Positionen berechnen. Im Unterschied zur Berechnung unter 2.1.3.1. handelt es sich jetzt nicht mehr um Wahrscheinlichkeitsangaben, sondern um Häufigkeitszahlen, die man einer Stichprobe mit einem Umfang von $2,2 \times 10^3$ Np aus einer Grundgesamtheit von circa 1×10^8 Np entnimmt.

Auf der Basis einer 2350 Einheit erhält man eine Divergenz, die kleiner als 4% sein muß (2.1.3.1.). Für eine 23 Np Einheit beträgt die Divergenz der Sau - Segmente 12%, des Pvu - Segmentes B 25% und des Pvu - Segmentes D 22%. Für andere Einheiten ändert sich die Divergenz der Sau - Segmente nicht. Für Pvu - Segment D hingegen ergeben sich für Einheiten von 46 oder 92 Np Divergenzen von 17% oder 15%.

Die 23 Np Prototypsequenzen beider Segmenttypen lassen sich in zwei Einheiten von 12 Np zerlegen, falls man jeweils in einer 12 Np Einheit die Position 9 nicht mit einer Base besetzt (Abb. 12). Vergleicht man die beiden 23 Np Prototypsequenzen miteinander, stimmen 14 von 23 Basen in

A	A	T	C	A	A	G	C	A	G	C	T	) 23 Np Prototypsequenz von Pvu-Segment D	
C	A	G	C	A	G	G	C	A	A	A	T		
G	A	T	C	A	C	G	T	G	A	C	T		) 23 Np Prototypsequenz der Sau-Segmente
G	A	T	C	A	T	G	C	A	C	T			

Abb. 12: Vergleich der Prototypsequenzen aus Pvu - und Sau - Segmenten

Die in Abb. 11 abgeleiteten Prototypsequenzen werden miteinander verglichen. Identische Nukleotide in gleichen Positionen, die sich aus der Darstellungsform einer 12 Np Einheit ergeben, sind umrahmt.

Pvu - und Sau - Segmenten überein. Wählt man die Darstellungsform einer 12 Np Einheit, findet man jeweils 5 Positionen, die in allen 4 Einheiten übereinstimmen. Außerdem sind noch 4 Positionen in 3 von 4 Einheiten und 1 Position in 2 von 4 Einheiten identisch (Abb.12). Aus diesen Ergebnissen lassen sich Rückschlüsse auf die Entstehung der 1,706 Satelliten-DNA ziehen (3.1.).

2.1.3.4. Symmetrieelemente in der Prototypsequenz

In der Prototypsequenz der Sau - Segmente existieren verschiedene Symmetrieelemente: sechs Elemente mit punktsymmetrischer Sequenzanordnung und ein Element mit Spiegelsymmetrie (Abb.13). Nur ein Nukleotidpaar in Position 11 ist nicht Teil eines Symmetrieelementes.

• C T G A T C A C G T G A C T G A T C A T G C A C T • •

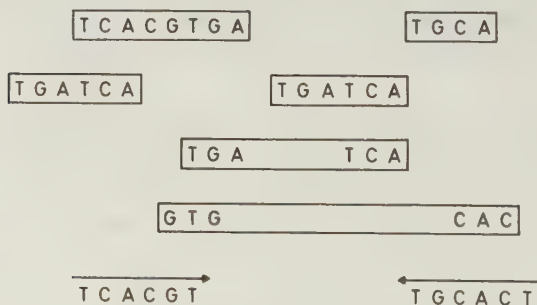


Abb. 13: Symmetrieelemente in der Prototypsequenz der Sau - Segmente

Symmetrieelemente mit punktsymmetrischer Sequenzanordnung in einem DNA-Doppelstrang (zweiachsige Rotationssymmetrie)

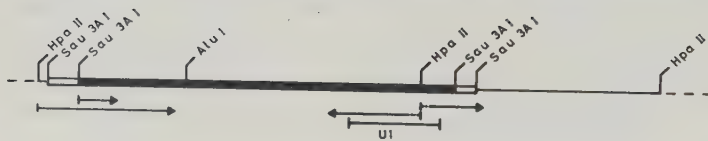
sind eingerahmt. Ein Element mit spiegelsymmetrischer Anordnung ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die Sequenz nur eines Stranges ist aufgeführt.

2.2. Analyse einer mittelrepetitiven Sequenz aus Kalbsthymus-DNA

Bei Klonierungsexperimenten mit Sau 3A I - Partialhydrolysaten der 1,706 Satelliten-DNA war ein Plasmid (3688, 4.1.1., Tabelle 1) entstanden, das außer 22 und 34 Np Satelliten-DNA auch ein Sau 3A I - Fragment einer Länge von 420 Np enthielt. Dieses Fragment war keiner Bande in Satelliten-DNA-Spaltmustern zuzuordnen. Ein Ausschnitt der Restriktionskarte des Plasmids 3688 ist in Abb. 14 dargestellt. Hieraus ist auch die Sequenzierrichtung und die Länge der ermittelten Sequenz ersichtlich. Da ursprünglich nur die 1,706 Satelliten-DNA-Sequenz ermittelt werden sollte, wurde das 420 Np - Fragment nur teilweise sequenziert. Die in Abb. 14 dargestellte Sequenz beruht nur auf wenigen Sequenzgelen jeweils eines DNA-Stranges. Deshalb kann man nicht völlig ausschließen, daß die ermittelte Sequenz in wenigen Positionen von der tatsächlichen Sequenz abweicht.

2.2.1. Hybridisierungsexperimente mit dem 420 Np - Fragment _ _ _ _ _

Die in dem Plasmid 3688 gefundene Verknüpfung des 420 Np - Fragmentes mit 1,706 Satelliten-DNA könnte bereits in der



Sau 3A I

```

5'  G A T C T A G G A C   A T T C C T C T T A
    A C G C G C C A A C   G T G A G A G C G G
    A A A A G G G T T C   A C G T G T G G A T
    T G A A C G T G C C   A G A C G G C T T C
    T T A G T T T T C G   C T A T -15- Alu I
    ----- 150 ----- G G C T T C C T G T
    G C G A G A G A G T   G G G C T G T T A C
    A G T T C A T G G G   C T C C T C G C T G
    C G G T G G C T T C   T C T A G T C A C G
    G A G C A C G G C T   C T A G G G C A T G
    A G G G C T T C A A   C A G T T G T G G T
    T C ----- 12 ----- Hpa II - 4 - C C
    C C A G A G C A C A   G G C T C A G T A G
    T T G T C T T T C T   A G A T C
                                3'
                                Sau 3A I

```

Abb. 14: Ausschnitt aus der Restriktionskarte des Plasmids 3688 mit der ermittelten Teilsequenz

Der dargestellte Ausschnitt der Restriktionskarte des Plasmids 3688 umfaßt die inserierte Fremd-DNA (offener Balken: 1,706 Satelliten-DNA, ausgefüllter Balken: 420 Np - Sau 3A I - Fragment) und die angrenzenden

pBR 322 - Sequenzen (einfacher Strich). Die drei eingezeichneten Hpa II - Spaltstellen begrenzen die in Abb. 3 hervorgehobenen zwei zusätzlichen Hpa II - Fragmente. Die Pfeile kennzeichnen die Sequenzierrichtung und die Länge der ermittelten Partialsequenzen des 420 Np - Fragmentes. Mit U1 ist der Bereich gekennzeichnet, in dem die Sequenzhomologien zur U1 - RNA untersucht wurden (2.2.3. und Abb. 18). Unter der Restriktionskarte sind die entsprechenden Partialsequenzen eines Einzelstranges angegeben. Die Position der Restriktionsspaltstellen und die Anzahl der nicht ermittelten Nukleotide sind in der Sequenz eingezeichnet.

Genom-DNA so vorgelegen haben oder aber erst beim Ligierungsprozess zustande gekommen sein. Außerdem wäre es möglich, daß dieses Fragment in der 1,706 Satelliten-DNA-Fraktion mitisoliert wurde, da es mit der Satelliten-DNA wohl kovalent verbunden war, jedoch über andere Sequenzen als jene, welche im Plasmid 3688 vorhanden sind. Aus der ermittelten Teilsequenz von 239 Np läßt sich die zu erwartende Schwimmdichte in Caesiumchlorid-Gradienten berechnen; sie beträgt $1,713 \text{ g/cm}^3$. Es ist somit durchaus möglich, daß dieses Fragment als minore Komponente in der 1,706 Satelliten-DNA-Fraktion vorlag.

Durch Hybridisierungsexperimente sollte geklärt werden, in welchen Restriktionsfragmenten 420 Np - Fragment - Sequenzen in der Genom-DNA lokalisiert sind. Dazu wurde das 420 Np - Fragment isoliert (Abb. 15) und mit $\lambda^{32}\text{P}$ - Desoxyribonukleosidtriphosphaten markiert (4.10.). Mit dieser DNA wurde Kalbsthymus-DNA hybridisiert, die mit Eco RI, Hind III, Sau 3A I, Sau 96 I, Msp I, Alu I und Kombinationen dieser Restriktionsnukleasen gespalten war (4.9.). Dabei ergab sich ein Hybridisierungsmuster

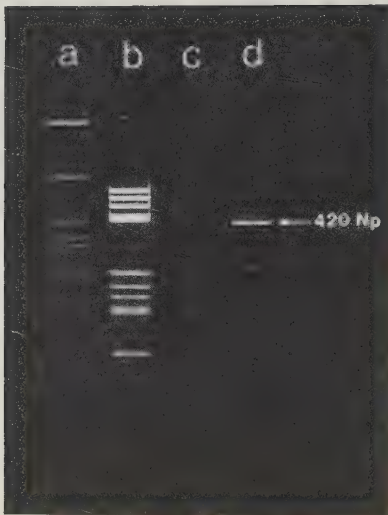


Abb. 15: Isolierung des
420 Np - Fragmentes

Das 420 Np - Sau 3A I -
Fragment wurde isoliert,
wie unter 4.3. beschrie-
ben, und zusammen mit ei-
ner Sau 3A I - Spaltung
des Plasmids 3688 auf ei-
nem 2%-igen Agarosegel
analysiert:

a) 3688 - Sau 3A I

b+c) pBR 322 - Bsp RI

d) isoliertes 420 Np -
Sau 3A I - Fragment.

das nicht aus diskreten Banden, sondern aus einem, über
den gesamten Fragmentgrößenbereich kontinuierlich ver-
teilten Signal bestand. In den mit Äthidiumbromid ange-
färbten Gelen waren jedoch vor der DNA-Übertragung auf
Nitrocellulose-Filter (4.9.) zahlreiche Satelliten-DNA-
Banden zu erkennen (Abb. 16). Das bewies, daß eine aus-
reichende Auftrennung von Fragmenten unterschiedlicher
Größe durch die Gelelektrophorese erfolgt war. Diese Er-
gebnisse wiesen darauf hin, daß Sequenzen in dem 420 Np -
Fragment mehrmals im Genom vorkommen und verschiedene
Randbereiche tragen.

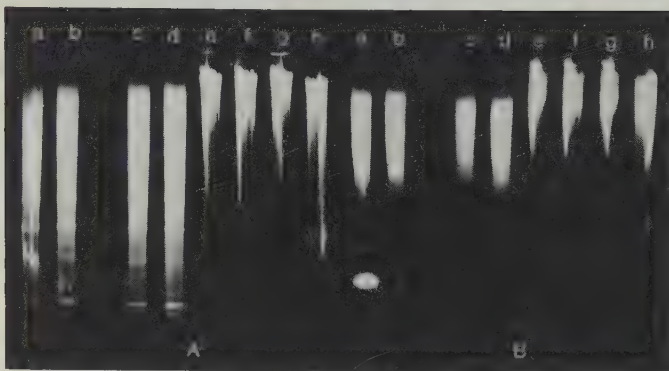


Abb. 16: Hybridisierung verschiedener Kalbsthymus-DNA-Spaltungen mit dem 420 Np - Fragment

Gesamte Kalbsthymus-DNA (jeweils eine A_{260} -Einheit) wurde mit verschiedenen Restriktionsnukleasen gespalten und auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (A, 4.3.). Nach dem Transfer auf Nitrocellulose-Filter (4.9.) wurde mit dem ^{32}P markierten 420 Np - Fragment (4.10.) hybridisiert. Im Autoradiogramm (B) erkennt man die Hybridisierungsbande des zugemischten 420 Np - Fragmentes (a). a - d) Sau 3A I - Partialhydrolysat, in a) + 5ng DNA des 420 np - Fragmentes. e - h) Hind III - Spaltung von Kalbsthymus-DNA; in f - h wurde zusätzlich mit unterschiedlichen Mengen Sau 96 I nachgespalten: f) 0,8 Einheiten/100 μ l, g) 0,08 Einheiten/100 μ l und h) 8 Einheiten/100 μ l.

2.2.2. Hybridisierungsexperimente mit der gesamten Kalbsthymus-DNA

Hybridisiert man auf Nitrocellulose-Filtern immobilisierte DNA-Fragmente (Hybridisierung nach Southern, 4.9.) mit markierter Genom-DNA, wird man nur dann im Autoradiogramm ein Signal finden können, wenn die DNA-Fragmente in mehreren Kopien in der Genom-DNA repräsentiert sind. Bei einer Genomgröße von circa 5×10^9 Np, einer Fragmentgröße

von 400 - 500 Np und einer spezifischen Radioaktivität der markierten Genom-DNA von 5×10^7 cpm/ μ g, könnte man unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen (50ng/3ml, 12 h bei 68°C) höchstens (bei 100% Hybridisierung des Genom-Fragmentes) 0,25 cpm in der entsprechenden Bande erwarten. Dieser Wert macht es unmöglich, Banden von der Schwärzung des Hintergrundes zu differenzieren (vergleiche auch Referenz 64). Bei der Suche nach einer hochrepetitiven Komponente, z.B. der 1,715 Satelliten-DNA, die einen Anteil von circa 5% an der gesamten Kalbsthymus-DNA hat (44), erhält man nach Hybridisierung von immobilisierten DNA-Fragmenten (Hybridisierung nach Southern, 4.9.) mit Gesamt-DNA bereits nach einer Exposition von wenigen Stunden ohne Verstärkerfolien starke Signale (vergleiche 2.3.4.). Aufgrund dieser Überlegungen haben auch andere Arbeitsgruppen (65 -68) abgeschätzt, wie häufig Sequenzen auf klonierten DNA-Fragmenten in Gesamt-DNA oder -RNA vortreten sind.

Um eine Verunreinigung durch Partialfragmente, welche die 22 oder 34 Np Satelliten-DNA enthalten und in dem gleichen Größenbereich hybridisieren könnten (siehe Abb. 14 und 15), auszuschließen, wurde das isolierte 420 Np - Sau 3A I - Fragment in pBR 322 subkloniert (4.1.1., Tabelle 1, 4.6.). Plasmid 3688-1 enthält nur das 420 Np - Fragment, und zwar in umgekehrter Orientierung verglichen mit der Einbaurichtung in Plasmid 3688. Restriktionsspaltungen der Plasmide 3688 und 3688-1 wurden mit ^{32}P markierter Kalbsthymus-DNA (4.10.) hybridisiert (4.9.). Hierbei hybridisierten nur Fragmente, die das 420 Np - Fragment oder Teile davon enthielten (Abb. 17). Ein Signal war aber erst nach einer Exposition von vier Tagen mit SE 6 - Verstärkerfolien (4.11.5.)



Abb. 17: Hybridisierungen von Spaltungen der Plasmide 3688 und 3688-1 mit Kalbsthymus-DNA

Klare Lysate (4.1.1.) des Plasmids 3688-1 wurden mit Hpa II (a) und Bsp RI (d) gespalten. Zusammen mit Hpa II - (b), Bsp RI - (e) und Sau 3A I - (g) Spaltungen des Plasmids 3688 und Hpa II - (c), Bsp RI - (f) und Sau 3A I - (h) Spaltungen von pBR 322 wurden sie auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt (A). Nach Transfer auf Nitrocellulose-Filter (4.9.) wurden sie mit der 32 P markierten gesamten Kalbsthymus-DNA (4.10.) hybridisiert (4.9.). Das Autoradiogramm (B) zeigt nach viertägiger Exposition mit SE 6 - Verstärkerfolien (4.11.5.) einzelne spezifische Hybridisierungsbanden. Sequenzen aus pBR 322 - DNA hybridisierten nicht mit Kalbsthymus-DNA. Die unterschiedliche Stärke des Hybridisierungssignals in g (Sau 3A I - Fragment ohne Satelliten-DNA-Sequenzen) gegenüber b (Hpa II - Fragment mit 34 Np 1,706 Satelliten-DNA) zeigt, daß die in Plasmid 3688 enthaltenen Satelliten-DNA-Bereiche das Hybridisierungssignal verstärken.

deutlich zu erkennen (Abb. 17). Nach der oben geschilderten Abschätzung muß deshalb die Sequenz des 420 Np - Fragmentes in der gesamten Genom-DNA in mäßig repetitierter Form vorliegen. Auch der Vergleich der Stärke des

Hybridisierungssignals in Abb. 17 B g) mit 17 B b)), zeigt, daß die Sequenz des 420 Np - Fragmentes in der Genom-DNA nicht in hochrepetitiver Form vorliegen kann.

2.2.3. Analyse einer Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes

Beim Vergleich der Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes mit verschiedenen veröffentlichten DNA- und RNA-Sequenzen zeigten sich Sequenzhomologien mit einer RNA aus Novikoff - Hepatoma - Aszites - Zellen, deren Primärstruktur von H. Busch und Mitarbeitern aufgeklärt wurde (69). Diese 171 Nukleotide lange RNA gehört zu einer Gruppe kleiner RNAs von 90 - 220 Nukleotiden Länge, die in zahlreichen Kopien (10^6 Kopien/Zelle) im Zellkern vieler Organismen vorkommen und als snRNAs bezeichnet werden. Ein Teil dieser U1-RNA-Sequenz zeigt Übereinstimmungen mit der Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes. In Abbildung 18 wird eine Teilsequenz der U1-RNA, die in Form des nicht transkribierten DNA-Stranges dargestellt ist, mit einer Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes verglichen. Die U1-RNA weist an ihrem 5' - Ende drei modifizierte Nukleotide auf, von denen das erste (G) in einer Triphosphatesterbindung in 5'-5' Verknüpfung mit dem zweiten Nukleotid verbunden ist (69). Da bis heute noch nicht nachgewiesen wurde, wie diese "Cap"-Einheit an die transkribierte RNA angehängt wird, wurde die Sequenz erst ab dem zehnten Nukleotid der U1-RNA mit der 420 Np - Fragment - Teilsequenz verglichen.

Inwieweit sind die Sequenzhomologien in Abbildung 18 Ausdruck einer echten Verwandtschaft dieser Sequenz mit der

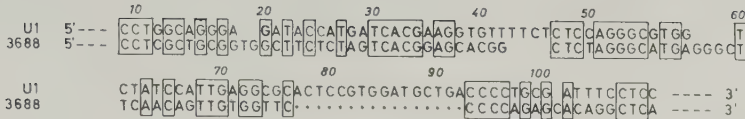


Abb. 18: Sequenzhomologien zwischen der U1-RNA-Sequenz und einer Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes

Die Sequenz der U1-RNA aus Novikoff-Hepatoma-Zellen (69) wurde mit einer Teilsequenz des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes aus Plasmid 3688 verglichen. Die Nummerierung der U1-RNA-Sequenz ist der Referenz 69 entnommen. Die U1-RNA ist in die entsprechende DNA-Sequenz des nicht transkribierten Stranges umgeschrieben. Bei der Zuordnung beider Sequenzen müssen Lücken innerhalb der Sequenz gelassen werden, um maximale Homologie zu erreichen. Punkte in der 3688-Sequenz symbolisieren nicht ermittelte Nukleotide. Identische Sequenzbereiche sind umrahmt.

U1-RNA-Sequenz? Um diese Frage zu beantworten, kann man die Wahrscheinlichkeiten für derartige Sequenzen in einer Zufallssequenz berechnen. Hierfür kann man sich zweier verschiedener Ansätze bedienen. Formel 1 in Abbildung 19 bestimmt die Häufigkeit einer Sequenz der Länge n , die in jeder b e l i e b i g e n Position in einer Anzahl von Basen j von der Vergleichssequenz abweicht. Formel 2 (Abb. 19) legt die Häufigkeit einer Sequenz fest, in der einige Positionen mit bestimmten Basen besetzt werden, während andere d e f i n i e r t e Positionen mit beliebigen Basen besetzt sein können. Formel 2 legt eindeutig die Länge einer Sequenz fest, welche statistisch einmal in einer Genom-DNA vorkommt. Diese Länge beträgt für Kalbsthymus-DNA circa 16 Nukleotidpaare. Aus Abbildung 18 kann man aber entnehmen, daß hier 47 von 108 Positionen in

beiden Teilsequenzen mit gleichen Basen besetzt sind
(siehe 3.2.2.).

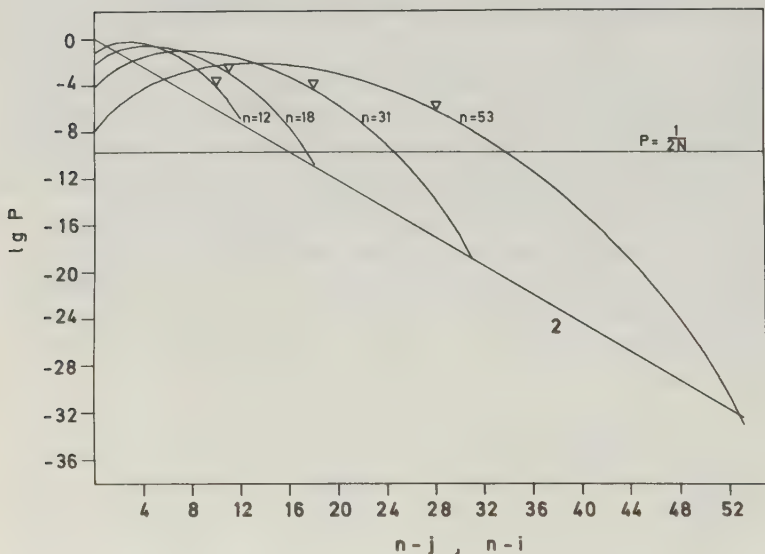


Abb. 19: Graphische Darstellung der Wahrscheinlichkeit
für das Vorkommen definierter Sequenzen in Zufallssequenzen

In der Formel 1:

$$P_{n,j} = P_A^{(1-2P_A j)} \times P_G^{(m-2P_G j)} \times 0,75^j \frac{n!}{j!(n-j)!}$$

stellt $P_{n,j}$ die Wahrscheinlichkeit für eine Sequenz der
Länge n in einem DNA-Doppelstrang dar, die in j beliebigen
Positionen mit beliebigen Basen besetzt ist (70).

$$P_{n,i} = P_A^{\frac{1}{n}(n-i)} \times P_G^{\frac{m}{n}(n-i)} \quad (\text{Formel 2})$$

legt hingegen die Wahrscheinlichkeit für eine Sequenz der Länge n in einem DNA-Doppelstrang fest, die in i definierten Positionen mit beliebigen Basen besetzt ist (70).

Im einzelnen bedeuten:

P_A : Häufigkeit für A in der gesamten Genom-DNA

P_G : Häufigkeit für G in der gesamten Genom-DNA

l : Anzahl A's in einer Sequenz der Länge n

m : Anzahl G's in einer Sequenz der Länge n

N : Anzahl der Basenpaare in der gesamten Genom-DNA

Die Werte für P_A , P_G und N bei Kalbsthymus-DNA wurden der

Referenz 71 entnommen. Die Anzahl der definierten Basen $n-j$ bzw. $n-i$ wurde gegen $\lg P_{n,j}$ bzw. $\lg P_{n,i}$ aufgetragen.

Die Funktion, welche durch Formel 1 definiert ist, wurde für verschiedene Sequenzabschnitte mit 53, 31, 18 und 12 Positionen aus dem Sequenzvergleich in Abb. 18 bestimmt.

Die durch Sequenzvergleich gefundenen Werte für $n-j$ bei verschiedenem n (als Anzahl identischer Nukleotide) ist auf jedem Graph markiert (∇). Jedem dieser vier Werte ist dadurch eine definierte Wahrscheinlichkeit P zugeordnet.

In Formel 2 ist $P_{n,i}$ in einfacher Weise direkt von der Anzahl der definierten Basen $n-i$ abhängig und ergibt bei

halblogarithmischer Auftragung eine Gerade, welche mit 2 gekennzeichnet ist. Alle Wertepaare der durch die Formeln 1 und 2 festgelegten Funktionen, die unterhalb der

Geraden $P = \frac{1}{2^N}$ liegen, charakterisieren Sequenzen, die - statistisch gesehen - weniger als einmal im Rinder-genom vorkommen.

2.3. Versuche zur Klonierung von Randsegmenten der 1,706 Satelliten-DNA

Die Beziehung der Sequenz des 420 Np - Fragmentes zur 1,706 Satelliten-DNA (2.2.) läßt sich wegen der zahlreichen Kopien dieser Sequenz in der Genom-DNA durch

Hybridisierungsexperimente nicht klären. Deshalb sollte versucht werden, gezielt Bereiche zu klonieren, die an den Übergängen von 1,706 Satelliten-DNA- zu anderen Sequenzen lokalisiert sind.

Hierzu wurde folgende Strategie angewandt. Lineare pBR 322 - DNA transformiert Bakterienzellen schlechter (im Verhältnis $1:10^3$) als zirkuläre DNA (72). Ist die Bildung ringförmig geschlossener DNA von einer bestimmten Anordnung fremder DNA-Fragmente und der linearisierten Vektor-DNA abhängig, kann man durch die Transformation die Klonierung spezifischer Fragmente aus einem Fragmentgemisch erreichen. Wenn die Fragmente nur an einem Ende ein kurzes, durch eine bestimmte Restriktionsnuklease erzeugtes Einzelstrangende, am anderen Ende aber einen circa 400 Nukleotide langen, durch Exonuklease III freigelegten Einzelstrang tragen, können die kurzen Enden mit Vektor-DNA verknüpft werden, die durch die gleiche Restriktionsnuklease linearisiert wurde. Diese DNA kann nur dann zu einem Ring geschlossen werden, wenn die langen Einzelstrangenden zueinander komplementär sind. Wird bei der Spaltung von Kalbsthymus-DNA ein Fragmentende durch die Erkennungssequenz einer Restriktionsnuklease, die in der Satelliten-DNA nicht vorkommt, bestimmt, das andere Ende aber durch eine Nuklease freigelegt, welche die Satelliten-DNA häufig spaltet, ermöglicht dies die Klonierung von Satelliten-DNA-Randfragmenten.

2.3.1. Fraktionierung von Kalbsthymus-DNA und Vorbehandlung mit Exonuklease III _ _ _

Da circa 4% der Kalbsthymus-DNA aus 1,706 Satelliten-DNA besteht (44), sollte vor der Klonierungsprozedur der größte Teil an 1,706 Satelliten-DNA-Sequenzen abgetrennt werden. Hierdurch hoffte man, die Anzahl der Plasmide reduzieren zu können, die nur Satelliten-DNA eingebaut enthalten. Das läßt sich durch Spaltung mit Pvu II verwirklichen (Abb. 20, siehe auch Abb. 1).

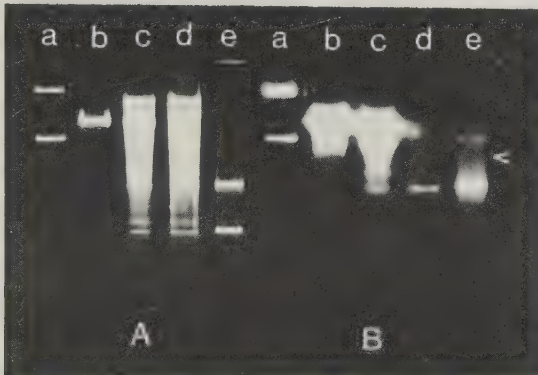


Abb. 20: Hybridisierung von Kalbsthymus- und
1,706 Satelliten-DNA nach Pvu II - Spaltung mit
Plasmid 175

Die Restriktionsfragmente wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (A, 4.3.) und nach dem Transfer (4.9.) mit 32 P markierter Plasmid 175 -DNA (4.10.) hybridisiert. Das Autoradiogramm (B) zeigt in Bahn d, daß oberhalb der

durch den Pfeil gekennzeichneten Fragmentgröße kaum noch DNA vorhanden ist, die mit der 1,706 Satelliten-DNA aus Plasmid 175 hybridisiert. Fragmente kleinerer Größe wurden bei der anschließenden präparativen Elektrophorese (4.5.) abgetrennt und verworfen. a) ungespaltene pBR 322 - DNA; b - e) Pvu - Spaltungen von pBR 322 (b), pBR 322 + Kalbsthymus-DNA (c), Kalbsthymus-DNA (d) und 1,706 Satelliten-DNA (e).

Die mit Pvu II gespaltene DNA wurde mit Hilfe der präparativen Gelelektrophorese nach Southern (4.5.) von über 90% der Sequenzen befreit, die mit 1,706 Satelliten-DNA hybridisieren. Mit Exonuklease III aus *Escherichia coli* wurden lange Einzelstrangenden am 5' - Ende der Pvu II - Fragmente erzeugt (4.4.). Die Bedingungen, unter denen Exonuklease III circa 400 Nukleotide lange Einzelstränge freilegt, wurden vorher an pBR 322 - DNA getestet, die mit Hind III linearisiert war (Abb. 21, 4.4.).

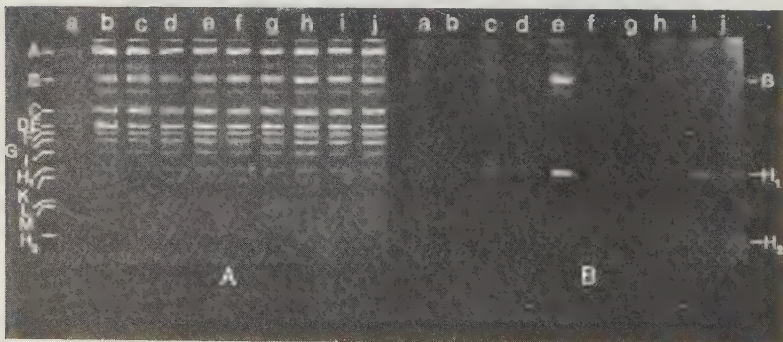


Abb. 21: Exonuklease III - Test mit linearisierter pBR 322 - DNA

pBR 322 - DNA wurde mit Hind III gespalten. Jeweils 4 μ g

dieser DNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l mit verschiedenen Mengen Exonuklease III unterschiedlich lang behandelt und nach Hitze-Inaktivierung des Enzyms mit dem Klenow-Fragment von Polymerase I und 32 P markierten Nukleosidtriphosphaten inkubiert (4.4.). Nach Spaltung mit Sau 96 I wurden die Proben auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt (A, 4.3.). Die Photographie dieses Gels (A) und das Autoradiogramm (B) zeigen in Bahn a, daß kein Sau 96 I - Hind III - Fragment radioaktiv markiert wird, wenn man die Behandlung mit Exonuklease III wegfallen läßt. Für die Proben der Bahnen b - e wurde 1 Einheit Exonuklease III bei einer Inkubationsdauer von 1 min. (b), 2 min. (c), 7 min. (d) und 30 min. (e) verwendet. Die Proben der Bahnen f - j wurden mit 0,1 Einheiten Exonuklease III für 1 min. (f), 2 min. (g), 7 min. (h), 30 min. (i) und 60 min. (j) behandelt. Die Restriktions-spaltstellen für Sau 96 I auf der pBR 322 - DNA sind durch die pBR 322 - DNA - Sequenz (J.G. Sutcliffe, persönliche Mitteilung) bekannt. Die Fragmente sind ihrer Größe nach mit Großbuchstaben bezeichnet. Fragment H wird durch Hind III in H_1 und H_2 zerlegt:

- G - B - H_2 - (Hind III) - H_1 - C - E - L -

H_1 und H_2 werden deshalb zuerst radioaktiv markiert. Überschreitet der Abbau mit Exonuklease III die Sau 96 I - Spaltstelle zwischen Fragment H_1 und C, wird auch Fragment C im Autoradiogramm sichtbar.

2.3.2. Klonierung einer Kalbsthymus-DNA-Fraktion und Analyse der hybriden Plasmide _ _ _ _ _

Das nach 2.3.1. erhaltene Fragmentgemisch wurde mit Pst I gespalten und in die Pst I - Spaltstelle von pBR 322 eingebaut (4.5., 4.7.). Hierbei erwartete man aufgrund der eingangs beschriebenen Kriterien Klone, die Randsegmente der 1,706 Satelliten-DNA enthalten sollten. Ungefähr 80 000 Kolonien wurden mit der Technik der Koloniehybridisierung auf eingebaute Satelliten-DNA-Sequenzen überprüft (4.7.).

Hierfür wurde mit ^{32}P markierter (4.10.) Satelliten-DNA hybridisiert (4.9.). Hybride Plasmide, die Satelliten-DNA enthalten, konnten als Hybridisierungs-DNA nicht benutzt werden, da sie wegen der in ihnen vorhandenen pBR 322-DNA mit allen Kolonien hybridisiert hätten. Abbildung 22 zeigt, daß sich die Hybridisierungssignale, die von einigen Transformanten erhalten wurden, in ihrer Intensität stark von denen unterscheiden, die Kolonien ergaben, welche das Plasmid 175 (vergleiche Abb. 4) enthielten.

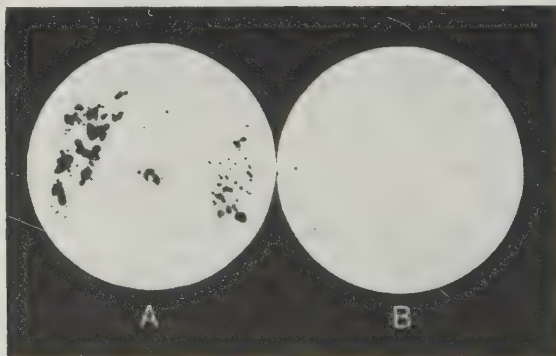


Abb. 22: Koloniehybridisierung von *Escherichia coli* - Kolonien

Die Autoradiogramme zweier Nitrocellulose-Filter nach Koloniehybridisierung mit ^{32}P markierter 1,706 Satelliten-DNA (4.7.) zeigen die unterschiedlichen Intensitäten der Hybridisierungssignale. In A enthielten alle Kolonien das Plasmid 175 (Kontrolle), in B wurden 2000 Kolonien nach Transformation (siehe Text) untersucht. Hier zeigten einige unterschiedlich schwache Hybridisierungssignale.

Plasmide aus 15 Klonen dieser Art wurden durch Restriktionsspaltungen und Hybridisierungsexperimente näher charakterisiert. Kein Plasmid enthielt DNA, die der 1,706 Satelliten-DNA zugeordnet werden konnte.

2.3.3. Identifizierung der klonierten Pst I - Fragmente

Zur Identifizierung der eingebauten Pst I - Fragmente wurden die hybriden Plasmide mit Pst I bzw. mit Pst I und Pvu II gespalten und nach Gelelektrophorese und Übertragung auf Nitrocellulose-Filter mit ^{32}P markierter 1,715 Satelliten-DNA oder markierter gesamter Kalbsthymus-DNA hybridisiert (4.9., 4.10.). Alle hybriden Plasmide enthielten Pst I - Fragmente, die mit 1,715 Satelliten-DNA hybridisierten (Abbildung 23). Diese Satelliten-DNA hat keine Sequenzhomologien mit 1,706 Satelliten-DNA (73) und zeigt nach Spaltung mit Eco RI repetitive Einheiten mit einer Länge von circa 1400 Np (10, 42, 43, 45, 74).

Pst I spaltet die 1,715 Satelliten-DNA in Fragmente, deren Länge 700 Np und Vielfache davon beträgt (45). Außer drei Plasmiden (020, 026, 054 in Abb. 23), enthielten alle hybriden Plasmide Pst - Fragmente mit einer Länge von 700 und 1400 Np.

Zusätzlich enthielten manche Plasmide Fragmente, die nur mit gesamter Kalbsthymus-DNA oder überhaupt nicht **hybridisierten**. Diese Pst I - Fragmente sind wahrscheinlich während des Ligierungsprozesses mit in den Vektor eingebaut worden. Sequenzen, die sicher in einer Anordnung vorliegen, welche der im Genom entspricht, dürfen nicht mit



Abb. 23: Spaltung einiger klarer Lysate mit Pst I und Hybridisierung mit 1,715 Satelliten- oder gesamter Kalbsthymus-DNA

Die klaren Lysate (Plasmide 01 - 099, 4.1.1.1.) wurden nach Spaltung mit Pst I (A,B) oder Pst I und Pvu II (C,D) auf 1%-igen Agarosegelen analysiert (4.3.) und nach Transfer auf Nitrocellulose-Filter (4.9.) mit 32 P markierter

1,715 Satelliten-DNA (B) oder 32 P markierter gesamter Kalbsthymus-DNA (D) hybridisiert (4.10., 9). Auf den einzelnen Bahnen wurden die Spaltungen folgender Plasmide aufgetrennt: b) 091, c) 054, d) 051, e) 048, f) 047, g) 044, h) 038, i) 026, j) 020, k) 025, l) 05. Die Bahn a) enthält mit Sau 96 I gespaltene pBR 322 - DNA. In beiden Autoradiogrammen (B,D) sind die Hybridisierungsbanden der Pst - Fragmente der klonierten 1,715 Satelliten-DNA sichtbar (700, 1400 Np). Bahn c, i und j enthalten Pst - Fragmente, die mit 1,715 Satelliten-DNA hybridisieren, aber keine Multimeren von 700 Np darstellen. Bei Hybridisierung mit gesamter Kalbsthymus-DNA stellen sich in D noch zusätzliche Banden dar, die anderen klonierten repetitiven Sequenzen entsprechen. Die zwei Fragmente, die in C in allen Plasmiden zu finden sind, entsprechen den beiden Pvu II - Pst I - Fragmenten aus pBR 322.

Pvu II oder Pst I spaltbar sein. Keines der eingebauten Pst - Fragmente trug eine Pvu II - Spaltstelle. Alle Plasmide waren durch Pvu II nur einmal an der in pBR 322 gelegenen Erkennungsstelle spaltbar (Abb. 23).

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Vertreter der Plasmide ausgewählt, die Pst I - Fragmente der 1,715 Satelliten-DNA enthielten, und ein Vertreter der Plasmide, bei denen zwar ein Pst I - Fragment mit 1,715 Satelliten-DNA hybridisierte, aber nicht die erwartete Größe (Vielfache von 700 Np) aufwies.

Klare Lysate (4.1.1.) der beiden Klone, die Plasmid 015 bzw. 026 enthielten, wurden mit ^{32}P markiert (4.10.). Sie wurden zur Hybridisierung (4.9.) von Restriktionsfragmenten eingesetzt, die aus Spaltungen von 1,706 und 1,715 Satelliten-DNA, sowie gesamter Kalbsthymus-DNA und DNA aus BAMD - Cs_2SO_4 - Gradientenfraktionen (4.1.2.) stammten. Plasmid 015 hybridisierte mit Fragmenten, die der 1,715 Satelliten-DNA zugeordnet werden konnten (Abb.24).

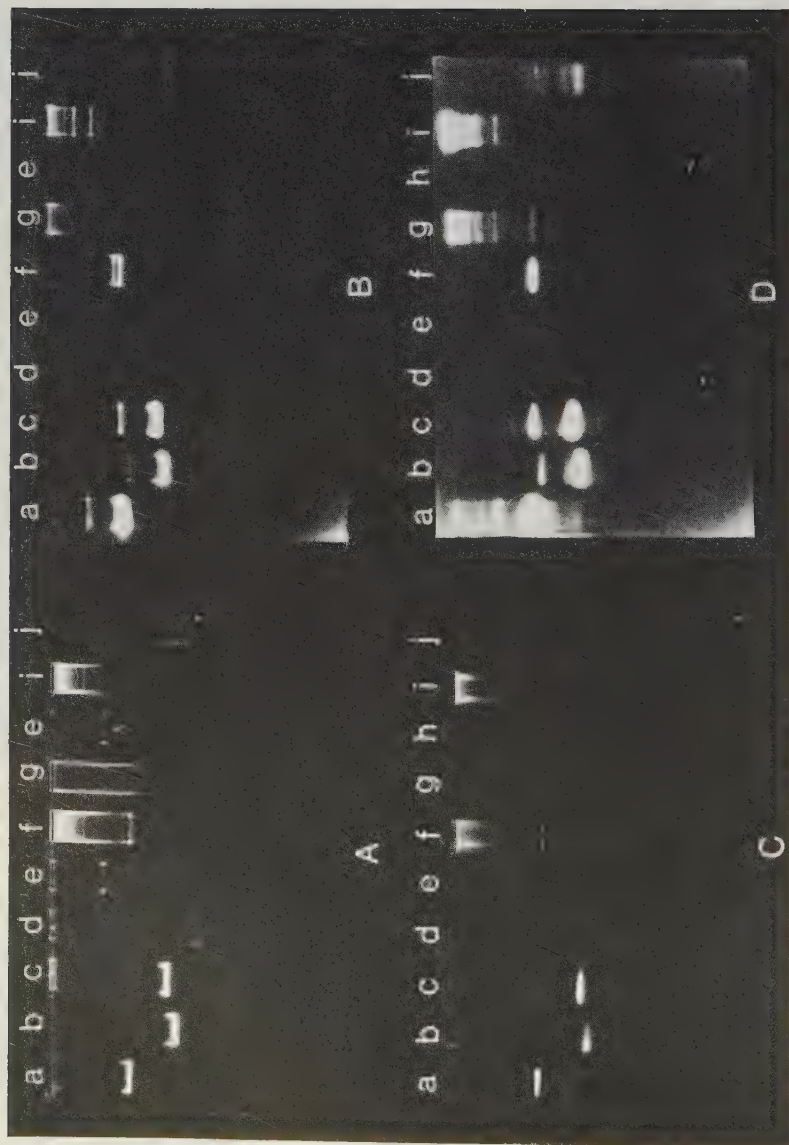


Abb. 24: Legende siehe nächste Seite

Abb. 24: Hybridisierung verschiedener Restriktions-spaltungen von Kalbsthymus- und Satelliten-DNAs mit den hybriden Plasmiden 026 und 015

Die Restriktionsspaltungen wurden auf 1%-igen Agarosegelen (A, C) analysiert (4.3.). Gleich bezeichnete Bahnen enthalten identische Proben. Nach dem Transfer (4.9.) wurde der Nitrocellulose-Filter eines Agarosegels (A) mit 32 P markierter Plasmid 026 - DNA hybridisiert (B). Der Filter des anderen Gels (C) wurde mit 32 P markierter Plasmid 015 - DNA hybridisiert (D). Die Bahnen der Gelphotographien (A, C) und Autoradiogramme (B, D) enthalten folgende Proben:
a - c) 1,715 Satelliten-DNA, die mit Eco RI (a), Alu I (b) oder Pst I (c) gespalten wurde.
d) Alu I - Spaltung von 1,706 Satelliten-DNA
e) Sau 96 I - Spaltung von 1,706 Satelliten-DNA
f - j) Kalbsthymus-DNA nach Spaltung mit Eco RI (f), Sau 3A I (g), Sau 96 I (h), Hind III (i) oder Alu I (j).

Im Vergleich dazu hybridisierte Plasmid 026 stärker mit Eco RI - Fragmenten der Größe von circa 1550 Np und 970 Np (45, 73; Abb. 24). Diese Eco RI - Fragmente wurden früher einer Unterfraktion der 1,715 Satelliten-DNA zugeordnet (73). Jedoch enthält eine Satelliten-DNA der Schwimmdichte $1,711 \text{ g/cm}^3$ diese Eco RI - Fragmente (45 und R.E. Streeck, weitere Versuche). Sie läßt sich von der 1,715 Satelliten-DNA abtrennen und wird als 1,711 b Satelliten-DNA bezeichnet (44). Diese Hybridisierungsexperimente ließen vermuten, daß alle Plasmide Sequenzen der 1,715 Satelliten-DNA enthielten und nur die Plasmide 020, 026 und 054 Sequenzen der 1,711 b Satelliten-DNA trugen.

2.3.4. Charakterisierung der Plasmide mit
1,711 b Satelliten-DNA _ _ _ _ _

Die Plasmide 020, 026 und 054 enthalten alle ein 1910 Np großes Fragment aus 1,711 b Satelliten-DNA. Kombinierte Spaltungen mit weiteren Restriktionsnukleasen zeigten, daß dieses Fragment bei allen drei Plasmiden in gleicher Weise gespalten wird (Abb.25). Die Spaltung mit Eco RI und Pst I ergab ein circa 1540 Np und ein circa 370 Np großes Fragment. Eine Spaltung mit Hind III zerlegte



Abb. 25: Hybridisierung von Restriktionsspaltungen der Plasmide 020, 026 und 054 mit 1,715 Satelliten-DNA
Restriktionsspaltungen von pBR 322 (m - q) und von klaren Lysaten mit den Plasmiden 054 (a - d), 020 (e - h) und 026 (i - l) wurden auf einem 1,5%-igen Agarosegel analysiert (A, 4.3.). Nach dem Transfer (4.9.) wurde mit ^{32}P markierter 1,715 Satelliten-DNA hybridisiert (B, 4.10).

Bahn q enthält eine Sau 96 I - Spaltung von pBR 322. Alle anderen Plasmide (a - p) wurden zunächst mit Pst I gespalten. Dann wurde ein Teil entweder mit Eco RI (a, e, i, m), Hind III (b, f, j, n) oder Bam HI (c, g, k, o) nachgespalten.

das 1910 Np große Pst I - Fragment in Fragmente von 1130 und 780 Np Länge, wobei das größere Hind III - Pst I - Fragment viel schwächer mit 1,715 Satelliten-DNA hybridisierte (Abb. 25) als das 780 Np - Fragment. Die 1,711 b Satelliten-DNA besitzt also außer Sequenzen, die zur 1,715 Satelliten-DNA homolog sind, auch nicht homologe Sequenzen.

Das konnte durch Spaltung mit Restriktionsnukleasen, die kleinere Bruchstücke erzeugen, bestätigt werden (Abb. 26). Es traten Fragmente auf, die dem 1910 Np großen Pst I - Fragment entstammten und nicht mehr mit 1,715 Satelliten-DNA, wohl aber mit gesamter Kalbsthy-mus-DNA hybridisierten, z.B. ein 672 Np großes Sau 3A I - Fragment oder ein 441 Np großes Bsp RI - Fragment. Dieses Bsp RI - Fragment fanden auch Bernardi und Mitarbeiter (Referenz 74: 446 Np - Fragment in Tabelle 2) bei Hae III - Spaltung (Hae III spaltet wie Bsp RI) von 1,711 b Satelliten-DNA. Einige andere Hae III - Fragmente, die in Referenz 74 beschrieben werden und mit der Multiplizität 1 vorkommen, entsprechen Bsp RI - Fragmenten in dieser Arbeit, die nicht mit 1,715 Satelliten-DNA hybridisieren. In Referenz 42 werden Bsu - Fragmente (Bsu spaltet dieselbe Sequenz wie Bsp RI) teilweise dem 1400 Np großen Eco RI - Fragment (entspricht in Ref. 42 dem 1300 Np - Eco RI - E - Fragment) und dem 970 Np großen

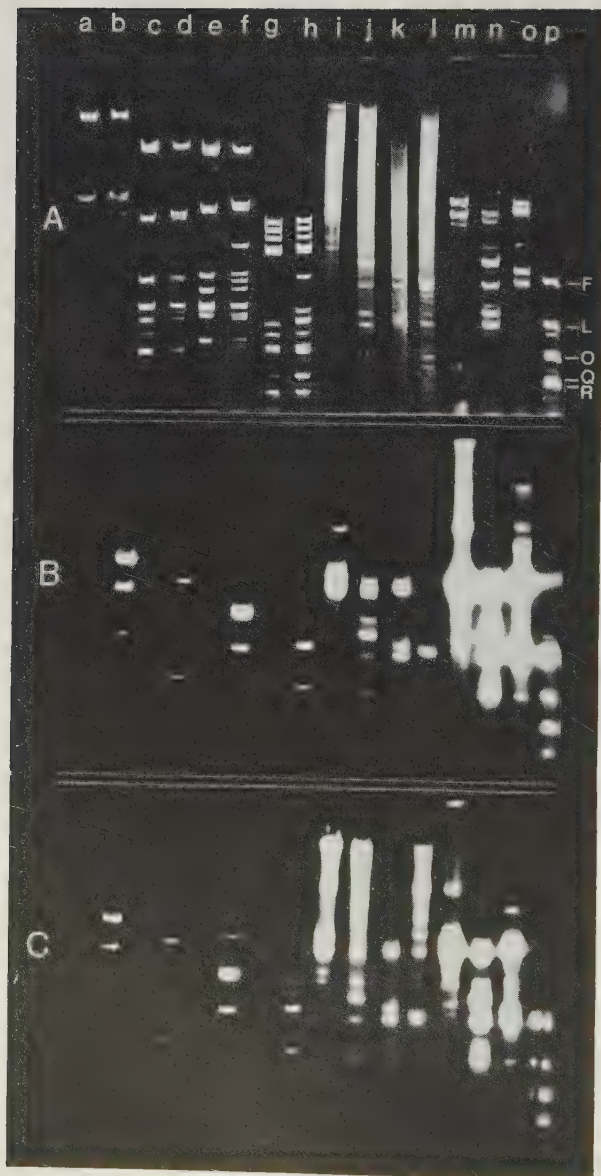


Abb. 26:

Legende siehe
nächste Seite

Abb. 26: Restriktionsspaltungen von pBR 322 -,
Plasmid 026 -, 1,715 Satelliten- und Kalbsthymus-DNA;
Hybridisierung mit 1,715 Satelliten- und gesamter
Kalbsthymus-DNA

Die Restriktionsspaltungen wurden auf einem 1,5%-igen
Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (4.3.),
photographiert (A) und auf ein Nitrocellulose-Filter
transferiert (4.9.). Nach Hybridisierung mit 32 P
markierter 1,715 Satelliten-DNA und Autoradiogra-
phie (B) wurde das Filter über Nacht bei 68°C in
einer Lösung aus 0,13% Polyvinylpyrrolidon,
0,13% Ficoll 400, 0,13% Serumalbumin und 50 µg/ml
denaturierter Lachsspermien-DNA gewaschen und dadurch
die hybridisierte, 32 P markierte 1,715 Satelliten-
DNA fast vollständig wieder abgelöst, was durch er-
neute Autoradiographie bestätigt wurde. Danach wur-
de mit 32 P markierter gesamter Kalbsthymus-DNA hy-
bridisiert (4.9.) und das Filter erneut exponiert (C).
Die Bahnen enthalten im einzelnen:

- a) pBR 322 - Pst I - Hind III - Eco RI;
- b) Plasmid 026 - Pst I - Hind III - Eco RI;
- c) pBR 322 - Pst I - Sau 96;
- d) Plasmid 026 - Pst I - Sau 96;
- e) pBR 322 - Pst I - Sau 3A I;
- f) Plasmid 026 - Pst I - Sau 3A I;
- g) pBR 322 - Pst I - Bsp RI;
- h) Plasmid 026 - Pst I - Bsp RI;
- i) Kalbsthymus-DNA - Pst I - Hind III - Eco RI;
- j) Kalbsthymus-DNA - Pst I - Sau 96;
- k) Kalbsthymus-DNA - Pst I - Sau 3A I;
- l) Kalbsthymus-DNA - Pst I - Bsp RI;
- m) 1,715 Satelliten-DNA - Pst I - Hind III - Eco RI;
- n) 1,715 Satelliten-DNA - Pst I - Sau 96 I;
- o) 1,715 Satelliten-DNA - Pst I - Sau 3A I;
- p) 1,715 Satelliten-DNA - Pst I - Bsp RI.

Die Bsp RI - Fragmente der 1,715 Satelliten-DNA sind
nach Referenz 42 bezeichnet.

Eco RI - Fragment (Eco RI - F) zugeordnet. Vergleicht man diese Zuordnung mit der Bsp RI - Pst I - Spaltung des Plasmids 026 und berücksichtigt das Hybridisierungsverhalten der Fragmente, kann man ungefähr die Bereiche auf dem Pst I - Fragment der 1,711 b Satelliten-DNA angeben, die nach Restriktionsspaltmuster und Hybridisierungsverhalten zur 1,715 Satelliten-DNA homolog sind. Bezieht man das Hind III - Spaltmuster (42, Abb. 24) mit ein, kann man eine Restriktionskarte der repetitiven Einheit der 1,711 b Satelliten-DNA erstellen (Abb.27).



Abb. 27: Restriktionskarte der 1,711 b Satelliten-DNA

Bei der Konstruktion der Restriktionskarte für eine repetitive Einheit wurden zum Teil Angaben aus den Referenzen 42 und 45 verwertet (unterbrochene Doppelbalken). Das Plasmid 026 enthält das 1910 Np große Pst I - Fragment (ausgezogener Doppelbalken). Der schmale Doppelbalken unter der Restriktionskarte gibt den Sequenzbereich an, der mit 1,715 Satelliten-DNA-Sequenzen homolog oder identisch ist. Hierbei bezeichnet der gestrichelte Doppelbalken den Bereich, in dem der Übergang zu nicht homologen Sequenzen lokalisiert sein muß.

2.3.5. Erklärung der Ergebnisse der Klonierungs- experimente - - - - -

Warum wurden bei diesen Experimenten Klone gefunden, die Plasmide mit 1,715 und 1,711 b Satelliten-DNA enthalten?

Hierfür sind verschiedene Begründungen möglich:

- 1) Die Spaltung der Kalbsthymus-DNA mit Pvu II und die Abtrennung der kleinen Fragmente führte zu einer Anreicherung dieser Satelliten-DNAs, da sich beide durch Pvu II nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß spalten lassen.
- 2) Durch die Pst I - Spaltung entstanden Fragmente homogener Größe dieser beiden Satelliten-DNAs. Sie wurden wegen ihrer relativen Häufigkeit (12%, Ref. 44) bevorzugt in Plasmide eingebaut. Außerdem werden Fragmente mit zwei Pst I - Enden gegenüber einer Kombination aus Fragmenten mit einem Pst I - Ende und einem Einzelstrangende nach Exonuklease III - Behandlung mit höherer Wahrscheinlichkeit den Vektor zirkularisieren können. Deshalb wurden keine Plasmide mit eingebauter 1,706 Satelliten-DNA gefunden.
- 3) Die 1,706 Satelliten-DNA, die zur Koloniehybridisierung benützt wurde, enthielt Spuren von 1,715 Satelliten-DNA und führte deshalb zu einem Hybridisierungssignal der Klone, die 1,711 b und 1,715 Satelliten-DNA enthielten. Das zeigte sich bei längerer Exposition der Autoradiogramme in Abbildung 24. Hierbei wurden in der Bahn mit den aufgetrennten Alu I - und Sau 96 I - Fragmenten der 1,706 Satelliten-DNA Hybridisierungsbanden sichtbar, die mit 1,715 Satelliten-DNA korrelierten.

3. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aufbau der 1,706 Satelliten-DNA untersucht. Beim Klonieren von Restriktionsfragmenten der Satelliten-DNA wurde zufällig auch eine Sequenz isoliert, die im Rindergenom zur Klasse der mittelrepetitiven DNA gehört. Beim Versuch, Randsegmente der 1,706 Satelliten-DNA zu klonieren, wurden keine Randfragmente gefunden, sondern die hybriden Plasmide enthielten Sequenzen, die zwei anderen Satelliten-DNAs des Rindergenoms zuzuordnen waren. Hybridisierungsversuche mit diesen Plasmiden führten zu weiteren Aussagen über Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Kalbsthymus-Satelliten-DNAs.

3.1. Struktur und Evolution der 1,706 Satelliten-DNA

Die Sequenzanalyse der 1,706 Satelliten-DNA ermöglichte die detaillierte Aufklärung der Primärstruktur dieser DNA. Die komplexe Struktur kann als das fixierte Bild einer sich ständig wandelnden Kombination neu entstehender und alter Sequenzelemente aufgefaßt werden. Soll diese "Momentaufnahme" den Ablauf widerspiegeln, der zu dem augenblicklichen Aufbau der 1,706 Satelliten-DNA führte, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1) Die Mutationsrate während der Satellitenevolution war relativ konstant.
- 2) Es wurde kein Selektionsdruck auf einzelne Sequenzen der Satelliten-DNA ausgeübt.
- 3) Der Zeitraum, der nach den Amplifikationen der einzelnen Sequenzmotive verstrich, spiegelt sich in unterschiedlichen Divergenzen bei verschiedenen Prototypsequenzen wieder.

3.1.1. Amplifikationsprozesse bei der Entstehung der
 1,706 Satelliten-DNA _ _ _ _ _

Richtigkeit der Voraussetzungen

Die erste und teilweise auch die zweite der geschilderten Voraussetzungen sind von mehreren Autoren in gleicher Weise den Betrachtungen zur Evolution von Satelliten- oder "spacer"-DNA zugrunde gelegt worden (6, 36, 39, 75).

Für die Richtigkeit der zweiten Voraussetzung spricht, daß keine Sequenzbereiche in den Prototypsequenzen von Pvu - und Sau-Segmenten zu finden waren, die besonders konserviert waren. Zusätzlich unterliegt die genaue Länge der Sau-Segmente keiner Selektion. Aus Restriktionsspaltmustern (R.E. Streeck), in denen neben majoren Banden zahlreiche minoren Banden einer durchschnittlichen Länge von $n \times 22,3$ Np zu finden sind, geht hervor, daß ein Teil der Sau-Segmente in ihrer Länge um 22 bzw. 23 Np und Vielfachen davon variieren kann.

Reihenfolge der Entstehung der Segmente

Die Entstehung einer 2350 Np - Einheit ist sicher einer der letzten Schritte in der Kette der evolutionären Ereignisse. Die Mitglieder der Population von 2350 Np - Einheiten sind einander so ähnlich, daß zufallsgemäß zwei aus 50 000 Kopien ausgewählt werden konnten, die in ihrer Sequenz mit der Prototypsequenz aus allen Kopien identisch waren, betrachtete man einen Teil der Einheit, nämlich die Pvu-Segmente D.

Der Entstehung einer 2350 Np - Einheit muß eine Einheit aus Pvu- und Sau-Segmentvorstufen vorangegangen sein. Pvu-Segment B und D sind in 92% ihrer Sequenz identisch und die ersten 23 Np der beiden angrenzenden Sau-Segmente A und C sind ebenfalls sequenzidentisch.

Vergleicht man die Prototypsequenz (bei einer 23 Np - Einheit) der Sau- mit der der Pvu-Segmente, wird offenbar, daß Sau- und Pvu-Segmente ihren Ursprung in einer gemeinsamen Sequenz, anscheinend einer 23 Np - Einheit, haben. Dabei sind Einheiten der Sau-Segmente untereinander homogener als die Einheiten der Pvu-Segmente. Das spricht für eine Entstehung der Sau-Segmente nach einer Amplifikation der Einheiten, die jetzt die Pvu-Segmente konstituieren. Prinzipiell könnten die Pvu-Segmente auch dadurch entstanden sein, daß sie aus einer homogenen Population von 23 Np - Einheiten durch Anhäufung von Mutationen wegen eingeschränkter Rekombinationshäufigkeit (siehe unten) ausgeschlossen wurden. Da aber nach den oben dargelegten Voraussetzungen keine Sequenzen durch Selektion konserviert wurden, müßten trotzdem die Sau-Segmente aus einer neuen Amplifikation einer spezifischen Einheit hervorgegangen sein. Zudem spricht auch die Unterteilungsmöglichkeit der Pvu-Segmente in verschieden große repetitive Einheiten für eine Entstehung der Segmente in der Reihenfolge:

- 1) Pvu-Segmentvorstufe, 2) Sau-Segmentvorstufe,
- 3) 2350 Np - Einheit.

Entstehung der Segmente aus kleineren Einheiten

Bezieht man die ersten 23 Np der Sau-Segmente in die Divergenzberechnungen der Pvu-Segmente mit ein, findet

man steigende Divergenzen, falls man Prototypsequenzen der Länge 92, 46, 23 und 12 Np zugrunde legt. Die Satelliten-DNA kann also aus einem Dodekanukleotid entstanden sein. Aus diesem Dodekanukleotid wurde in mehreren Stufen eine Sequenz sich wiederholender Einheiten mit einer Größe von 276 Np (Abb. 28).

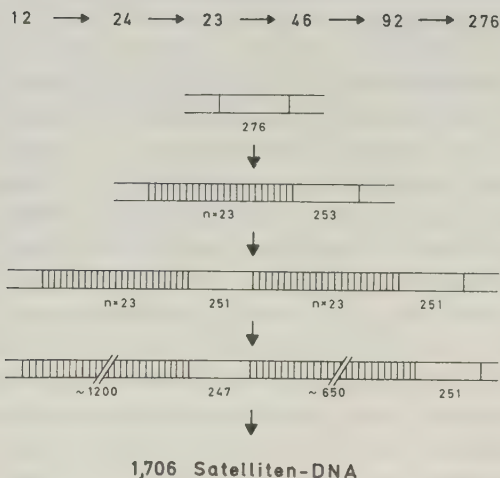


Abb. 28: Evolutionsschema der 1,706 Satelliten-DNA

Das Evolutionsschema ergibt sich aus den in der Diskussion dargelegten Überlegungen. Für jede "Stufe" wurde nur eine repetitive Einheit eingezeichnet, die eine Vielzahl von Kopien repräsentiert. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Länge der Einheiten in Np.

Auf jeder dieser "Stufen" müssen Mutationen zur Divergenz der einzelnen Repetitionseinheiten beigetragen haben.

Diese Mutationen fanden jeweils an einer Vielzahl von Kopien einer Sequenz statt. Aus diesem "Angebot" wurden dann spezifische Sequenzen zufallsgemäß amplifiziert und bestimmten die neue Repetitionseinheit der nächsten Stufe. Andere Modelle, die zum Beispiel von einem Undekanukleotid ausgehen und verschiedene Insertionen annehmen, kann man nicht ausschließen.

Vergleich mit einer theoretischen Struktur für Satelliten-DNA nach G.P. Smith

Ein analoges Modell ist von G.P. Smith für Satelliten-DNA-Sequenzen erstellt worden (36). Durch Simulationen mit Hilfe eines elektronischen Rechners, in denen beliebige Abschnitte einer Sequenz amplifiziert werden, gelangte er zu Modell-Sequenzen, die den in dieser Arbeit ermittelten Satelliten-DNA-Sequenzen sehr ähneln. Der Mechanismus der Amplifikation beruht in diesem Modell auf nicht reziprokem Crossover, an dem homologe Sequenzen in verschiedenen Chromatid-Positionen teilnehmen. So entstehen sich wiederholende Einheiten, die sich durch erneutes Crossover innerhalb des repetitiven Registers schnell im Genom ausbreiten oder durch Deletion wieder verschwinden können. Das Entstehen neuer repetitiver Einheiten wird auf Crossover-Ereignisse außerhalb des repetitiven Registers aufgrund stochastischer Sequenzhomologien und anschließender Amplifikation der neuen Einheit zurückgeführt. Die beteiligten Mechanismen beruhen auf reinen Zufallsprozessen.

Die Struktur der 1,706 Satelliten-DNA steht mit diesem Modell in Einklang. Die großen Bereiche mit den vielen,

wenig divergierten Einheiten in den Sau-Segmenten liefern größere Homologiebereiche für nicht reziproke Crossover-Ereignisse außerhalb des repetitiven Registers als die Pvu-Segmente. So kann man auch erklären, warum die Varianz in der Anzahl der 23 Np - Einheiten auf die Sau-Segmente beschränkt ist. Zudem könnten Crossover-Ereignisse in den Sau-Segmenten - mit ihrer großen Zahl an Symmetrieelementen - häufiger als in den Pvu-Segmenten stattfinden, falls man einem Rekombinationsmodell folgt, das kürzere Sequenzen mit Punktsymmetrie (Palindrome) für Schleifenbildung, Einzelstrangbrüche an homologen Stellen in zwei DNA-Doppelsträngen und anschließenden Einzelstrangaustausch postuliert (76).

Ein zum Crossover alternativer Mechanismus für die Amplifikation palindromer Sequenzen wäre ein Prozess, der bei Prokaryonten für die Entstehung der IS 2-6 - Sequenz gefordert wurde und von den Autoren die Bezeichnung "slippage replication" erhielt (77). In diesem Modell werden infolge der Schleifenbildung durch palindromische Sequenzen in einem Strang während der Replikation Sequenzen, die am "Stamm" der Schleife lokalisiert sind, dupliziert. Im Laufe der Replikation können mehrere derartige "Haarnadeln" gebildet werden und zur Amplifikation palindromischer Sequenzen führen. Eine Satelliten-DNA, die zahlreiche Palindrome enthält, könnte durch einen ähnlichen Prozess amplifiziert werden.

3.1.2. Deletionen auf verschiedenen Stufen des Entstehungsprozesses _ _ _ _ _

Um die gegenwärtige Struktur der Satelliten-DNA erklären zu können, muß man auf mehreren Stufen des Evolutionsprozesses Deletionseignisse fordern: Beim Übergang der 24 Np - Einheit zur 23 Np - Einheit, bei der Entstehung der 251 Np großen Pvu-Segmentvorstufe aus einer 253 Np - Einheit, bei der Bildung des 247 Np großen Pvu-Segmentes B und bei den 22 Np - Einheiten in den Sau-Segmenten, die sich von den 23 Np - Einheiten durch die fehlende Besetzung jeweils der dreizehnten Position in der Einheit unterscheiden.

Vergleicht man die Sequenz der Pvu-Segmente im Bereich einer Deletion miteinander, besteht eine gewisse Ähnlichkeit zu der Situation im lac i Gen in Escherichia coli. Hier fanden P. Farabough und Mitarbeiter einen bevorzugten Rekombinationslocus, als sie viele spontan entstandene Mutanten miteinander verglichen (78, 79).

Die Sequenz an diesem Ort besteht aus einer dreimal wiederholten Einheit mit einer Länge von 4 Nukleotiden. Die Mehrzahl spontaner Mutationen im lac i Gen findet an dieser Stelle statt und führt zur Deletion einer der Tetranukleotid-Einheiten. Pvu-Segment B unterscheidet sich von Pvu-Segment D im Bereich der Deletion durch das Tetranukleotid ACAG (Abb. 10). Nimmt man als Sequenz vor dem Deletionseignis im Pvu-Segment deshalb die Sequenz TCAGACAGTCAG an, reicht der Austausch eines A gegen ein T, um ein dreimal repetiertes Tetranukleotid zu erzeugen,

aus dem nach Deletion der mittleren Einheit in einem nicht reziproken Crossover-Ereignis die gegenwärtige Sequenz TCAGTCAG hervorgegangen sein kann.

3.1.3. Vergleich mit der 5S rDNA aus Xenopus laevis

Der gesamte Aufbau dieser Satelliten-DNA erinnert an die AT - reichen "spacer"-Regionen in der 5S rDNA aus *Xenopus laevis*. Auch hier existieren zwei Regionen, die sich in der Sequenz ihrer repetitiven Einheiten sehr ähnlich sind (75). Die Region (A_2), deren repetitive Einheiten sich wenig voneinander unterscheiden, weist eine größere Längenheterogenität auf als eine andere Region (A_1 und A_3), die in der Sequenz ihrer Einheiten mehr divergiert ist. Allerdings lassen sich bei der A_1 - A_3 Region keine Prototypsequenzen unterschiedlicher Länge finden, so daß für die Evolution dieser Region kein Modell entworfen werden kann. Jedoch führen auch Fedoroff und Brown (75) die Homogenität innerhalb der A_2 -Region auf ihre erst relativ späte Entstehung durch Amplifikation kurzer repetitiver Einheiten zurück.

3.2. Zuordnung des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes

3.2.1. Beziehung des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes zur mittelrepetitiven DNA - - - - -

Mittelrepetitive DNA wurde bisher in allen Eukaryonten gefunden und ihre Organisation im Genom durch Reassoziationskinetiken ermittelt (80). Sie ist im Genom mit nicht repetitiver DNA verbunden (65, 68, 81, 82) und wird zum Teil transkribiert (83). Mittelrepetitive Sequenzen können an verschiedenen Stellen in das Eukaryonten-Genom integriert werden und verhalten sich somit wie die mobilen, translozierbaren Elemente in Prokaryonten. Diese eukaryontischen "Transposons" wurden im Drosophila- (84, 85, 86) und Hefe- (87) Genom nachgewiesen. Bei Drosophila konnten mittelrepetitive Sequenzen auch direkt auf kleinen, zirkularen DNAs gefunden werden (88).

Im Rindergenom findet man 8 - 14 Familien mittelrepetitiver Sequenzen. Sie haben eine durchschnittliche Länge von 350 Np und wechseln mit $4 - 5 \times 10^3$ Np nicht repetitiver Sequenzen ab (89). Aufgrund der unter 2.2.2. erörterten Kriterien kann man annehmen, daß Sequenzen auf dem 420 Np - Sau 3A I - Fragment im Rindergenom in mehreren Kopien vorliegen und zu einer dieser mittelrepetitiven Sequenzfamilien gehören.

3.2.2. Vergleich mit der Sequenz der U1 - RNA aus Hepatoma-Zellen - - - - -

Die in Abbildung 19 dargestellten Funktionen ermöglichen es, das Ausmaß an Sequenzhomologien zu beurteilen, die zwischen dem 420 Np - Sau 3A I - Fragment und der U1 - RNA aus Rattentumorzellen gefunden wurden. Die durch die Formel 1 definierte Funktion (Abb. 19) beschreibt die Wahrscheinlichkeit für alle möglichen Kombinationen einer Sequenz der Länge n (z.B. $n = 12$, $n = 18$, $n = 31$ oder $n = 53$), die in j Positionen von der Vergleichssequenz gleicher Länge abweicht. Soll die Wahrscheinlichkeit aller möglichen Kombinationen im gesamten Rindergenom der Größe N kleiner als 1 sein, so ist die Anzahl von Basenaustauschen j durch den Schnittpunkt einer Parallelen zur $n-j$ - Achse im Abstand $1/2N$ mit dem Graph der jeweiligen Funktion begrenzt. Läßt man sämtliche Kombinationen zu, kommt eine Sequenz, die an jeder beliebigen Position, z.B. insgesamt in 13 Nukleotidpaaren, von einer U1 - RNA - Teilsequenz mit einer Länge von 31 Np abweicht, sicher öfter als einmal zufallsgemäß im Genom vor. Somit ist es unwahrscheinlich, daß es sich um die DNA-Sequenz für eine Rinder - snRNA handelt, die der Ratten - U1 - RNA entspricht (90, 91).

In der Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes sind aber nur bestimmte Positionen mit anderen Nukleotiden als in der U1 - RNA - Sequenz besetzt. Formel 2 in Abbildung 19 beschreibt dann die Häufigkeit einer Sequenz, die in diesen festgelegten Positionen mit beliebigen Nukleotiden besetzt ist. Aus dieser Häufigkeit (2.2.3.) ergibt sich,

daß zufallsgemäß im Rindergenom keine Sequenz auftreten kann, die diese festgelegte "Gerüstsequenz" des 420 Np - Fragmentes aufweist. Die beobachteten, "signifikanten" Sequenzhomologien müssen nicht zwangsweise mit einer biologischen Relevanz der Sequenzabschnitte korrelieren. Sie sind aber zumindest ein Hinweis dafür, daß die Sequenz des 420 Np - Fragmentes für eine RNA aus der Gruppe der snRNAs codieren könnte.

In diesem Zusammenhang scheint der Vergleich der 420 Np - Fragment - Teilsequenz mit zwei weiteren RNA-Sequenzen von Interesse, die kürzlich von zwei Arbeitsgruppen ermittelt wurden. Georgiev und Mitarbeiter (92) sequenzierten klonierte DNA-Fragmente, die für Kern-RNAs codieren, welche als doppelsträngige RNAs nach Behandlung von Kern-RNA-Präparationen mit den Ribonukleasen T_1 und A erhalten werden. Diese "fold-back" RNA wird durch repetitive DNA-Sequenzen codiert. Harada und Kato (93) sequenzierten eine Kern-RNA, die mit polyA - haltigen RNAs im Kern und Zytoplasma assoziiert ist. Diese RNA wurde nach Saccharose-Gradientenzentrifugation und zweidimensionaler Gelelektrophorese isoliert und nach ihrem Sedimentationskoeffizienten als 4,5S RNA bezeichnet. Sie entspricht vielleicht der U7 - RNA in der Nomenklatur der snRNAs (91, 93). Vergleicht man die Sequenzen der "fold-back" RNA und 4,5S RNA miteinander, die beide aus Mäusezellen stammen, so findet man in 89% aller Positionen der 4,5S RNA Nukleotide, die mit denen der "fold-back" RNA identisch sind, falls man bei der Anordnung beider Sequenzen analog zu Abbildung 18 zwei Lücken einführt. Vergleicht man die Teilsequenz des 420 Np - Fragmentes mit der 4,5S RNA bzw. mit der "fold-back" RNA, findet man 48% bzw. 32% Homologien. C. Weissmann und Mitarbeiter (94) haben nach einer Abzählregel beim Vergleich

der DNA-Sequenzen für β -Globin aus Maus und Kaninchen auch eine begrenzte Anzahl von Lücken in beide Sequenzen eingeführt, um die bestmögliche Homologie zwischen den Sequenzen zu erreichen. Verglichen sie nach derselben Regel Zufallssequenzen miteinander, fanden sie höchstens 31% Homologien. Dieser Wert stellt somit eine Art Grenzwert dar, der überschritten werden muß, will man Sequenzhomologien eine biologische Bedeutung beimessen. Nach diesen Kriterien weist die 420 Np - Teilsequenz "signifikante" Homologien mit der U1 - RNA und 4,5S RNA auf.

Der U1 -RNA wurde kürzlich eine Rolle beim Spleißen eukaryontischer RNA zugeschrieben, wobei unter anderem Sequenzhomologien zum komplementären Strang einer "Consensus"-Sequenz aus zahlreichen "Exon-Intron" - Übergängen ausschlaggebend waren (91). Homologien zum komplementären Strang dieser "Consensus"-Sequenz finden sich auch in verschiedenen Sequenzabschnitten in der 4,5S und "fold-back" RNA. In einem Bereich (Position 4 - 21 der U1 - RNA - Sequenz) der U1 - RNA, 4,5S RNA, "fold-back" RNA und der 420 Np - Fragment - Teilsequenz, in dem beim Vergleich aller Sequenzen diese zur "Consensus"-Sequenz komplementäre Basenabfolge plaziert werden könnte, ist die Homologie zwischen den vier Sequenzen zu gering, um verbindliche Aussagen über eine Funktion dieser Bereiche beim Spleißen von RNA treffen zu können.

Trotzdem kann man Vermutungen darüber anstellen, daß zwischen mobilen, translozierbaren Elementen, mittel-repetitiven DNA-Komponenten und dem "splicing"-Prozess eukaryontischer RNA Zusammenhänge bestehen.

3.3. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Kalbsthymus-Satelliten-DNAs

In Kalbsthymus-DNA konnten bisher acht verschiedene Satelliten-DNAs und weitere minore, repetitive Komponenten unterschieden werden (44). Bereits durch Spaltung mit wenigen Restriktionsnukleasen lassen sich einige gleich große Fragmente in den verschiedenen Satelliten-DNAs finden (42, 74). Ein detaillierter Vergleich dieser Satelliten-DNAs könnte die Frage eines gemeinsamen Ursprungs aller Satelliten-DNA-Sequenzen klären.

3.3.1. Vergleich der 1,720 mit der 1,706 Satelliten-DNA

In diesem Labor wurde auch die Prototypsequenz einer Kalbsthymus-Satelliten-DNA der Schwimmdichte $1,720 \text{ g/cm}^3$ ermittelt (95). Sie besteht aus 46 Np, von denen 76% mit der Prototypsequenz des Pvu-Segmentes B identisch sind. Das unterstützt das unter 3.2. entworfene Evolutionsschema, wobei diese Satelliten-DNA der 46 Np - "Stufe" in der Evolution der 1,706 Satelliten-DNA entspricht. Der Block aus 46 Np - Einheiten wurde im Verlauf der Amplifikation der 92 Np - Einheit nicht durch Deletionen eliminiert. Diese Satelliten-DNA müßte also auch in anderen Arten zu finden sein, die mit dem Hausrind verwandt sind.

3.3.2. Vergleich der 1,711 a, 1,711 b, 1,715 und
1,706 Satelliten-DNAs - - - - -

Aus der 1,706 Satelliten-DNA oder einer ihrer Vorstufen kann eine Satelliten-DNA der Schwimmdichte $1,711 \text{ g/cm}^3$ (1,711 a Satelliten-DNA) hervorgegangen sein. Diese Satelliten-DNA besteht aus Sequenzen, die den Pvu- und Sau-Segmenten sehr ähnlich sind (R.E. Streeck, unveröffentlichte Ergebnisse). Sie enthält aber zusätzlich in jeder großen repetitiven Einheit Sequenzblöcke, die in sich nicht repetitiv und von der 1,706 Satelliten-DNA-Sequenz völlig verschieden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Satelliten-DNA mit der Schwimmdichte $1,715 \text{ g/cm}^3$ mit klonierten Pst I - Fragmenten der 1,711 b Satelliten-DNA verglichen. Auch in der 1,711 b Satelliten-DNA finden sich Restriktionsfragmente, die nicht mit 1,715 Satelliten-DNA hybridisieren. Die nicht repetitiven Bereiche in der 1,711 a Satelliten-DNA hybridisieren mit 1,711 b Satelliten-DNA (R.E. Streeck, unveröffentlichte Ergebnisse). Somit lassen sich fünf der bisher bekannten acht Satelliten-DNAs aus Kalbsthymus zueinander in Beziehung setzen. Für eine vollständige Genealogie müßten jedoch noch mehr Satelliten-DNAs mindestens teilweise sequenziert werden.

3.3.3. Der komplexe Aufbau repetitiver Sequenzen in
Kalbsthymus-DNA - - - - -

Bei den vorliegenden Sequenzdaten erscheint es schon jetzt als wenig wahrscheinlich, daß sich alle Satelliten-DNA-Sequenzen aus Kalbsthymus auf ein gemeinsames Sequenzmotiv

zurückführen lassen. Die Satelliten-DNAs scheinen eher aus verschiedenen Kombinationen einiger, zum Teil ähnlicher Sequenzmotive aufgebaut zu sein.

Eine im Prinzip sehr ähnliche Struktur ist kürzlich für Satelliten-DNAs aus Roggenarten gefunden worden (41). Diese Satelliten-DNAs bilden hauptsächlich die telomeren Heterochromatinbereiche in *Secale cereale*. Auch in diesen verschiedenen Satelliten-DNA-Familien finden sich, auf der Ebene der Analyse mit Restriktionsnukleasen, komplexe Satelliten-DNAs, die sich aus repetitiven Einheiten verwandter Sequenzen und aus Sequenzbereichen zusammensetzen, die nicht aus kleineren repetitiven Einheiten bestehen. Ein komplexer Aufbau repetitiver Sequenzen kann daher nicht als ein Ausnahmefall angesehen werden.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1. Desoxyribonukleinsäuren

4.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Die Konstruktion der Plasmide 3691 und 3688 erfolgte im Rahmen der eigenen Diplomarbeit (46). Hierbei wurden Restriktionsfragmente einer Sau 3A I - Spaltung gereinigter 1,706 Satelliten-DNA in die Bam HI - Spaltstelle von pBR 322 (96) eingebaut. Die Konstruktion der Plasmide 22, 23, 42, 46, 101, 162, 175, 176 und 2801 erfolgte durch R.E. Streeck in analoger Weise unter Verwendung isolierter Restriktionsfragmente (Tabelle 1). Die Klonierungsexperimente, welche zu den hybriden Plasmiden 01 - 099 führten, sind ausführlich unter 2.3. und 4.5. dargestellt.

Die Plasmide 3691, 3688 und 175 wurden nach Referenz 97 isoliert. Klare Lysate des Subklones 3688-1 wurden nach der gleichen Methode hergestellt. Hierbei wurde der Zentrifugationsschritt in Caesiumchlorid ausgelassen und das klare Lysat 24 Stunden gegen 10 mM Tris-HCl pH 8,0 , 1 mM EDTA dialysiert. Die Plasmide 01 - 099 wurden nach Amplifizierung durch Zugabe von Chloramphenicol (200 µg/ml) in 10 ml L-Medium (98) entsprechend der Referenz 99 in Form klarer Lysate isoliert. Die Plasmide 22, 23, 42, 46, 101, 162, 176 und 2801 wurden nach Referenz 97 isoliert und von R.E. Streeck zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit analysierten hybriden Plasmide sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der analysierten hybriden Plasmide

Plasmid	eingebaute Kalbsthymus-DNA	Integra- tionsstelle in pBR 322	Her- kunft	Abb.	S.
01 -	1,711 b Satelliten-DNA			23	46
	1,715 Satelliten-DNA	Pst I	a	25	50
099	u. weitere Fragmente			26	52
22 -	1,706 Satelliten-DNA			4	11
	(isolierte Sau 3A I -	Bam HI	b	8	21
176	Partialfragmente)			10	23
	1,706 Satelliten-DNA			4	11
2801	(isoliertes Bcl I -	Bam HI	b	8	21
	Fragment)			10	23
	1,706 Satelliten-DNA			2	9
3691	(Sau 3A I - Partial-	Bam HI	c	4	11
	hydrolysats)			8	21
	1,706 Satelliten-DNA			3	10
	u. 420 Np - Fragment			4	11
3688	(Sau 3A I - Partial-	Bam HI	c	8	21
	hydrolysats)			14	30
				15	32
				17	35
3688-1	420 Np - Sau 3A I -	Bam HI	a	17	35
	Fragment (3688)				

Alle hybriden Plasmide wurden durch Einbau von Kalbsthymus-DNA in pBR 322 im Rahmen dieser Arbeit (a), der eigenen Diplomarbeit (c, 46) oder von R.E. Streeck (b) konstruiert.

4.1.2. Präparation von Satelliten-DNA

DNA der Kalbsthymus-Satelliten 1,706 und 1,715 und BAMD - Cs_2SO_4 - Gradientenfraktionen wurden, wie in Referenz 45 beschrieben, durch R.E. Streeck präpariert.

4.2. Restriktionsnukleasen und andere Enzyme

Die Restriktionsenzyme Alu I, Bcl I, Bsp RI, Eco RII, Hha I, Hind III, Hinf I, Pvu II, Pst I, Sau 3A I und Sau 96 I wurden von R.E. Streeck isoliert und zur Verfügung gestellt. Hpa II war ein Geschenk von H. Feldmann und Eco RI von T. Igo-Kemenes. Bam HI wurde von U.J. Hänggi zur Verfügung gestellt. Msp I und Hph I waren Produkte der Biolabs Inc., New England, U.S.A.

Hinsichtlich der Präparationsmethoden für diese Enzyme sei auf die Referenz 100 verwiesen. Die Spaltbedingungen entsprachen den Bedingungen in den Referenzen 25 und 45. DNA-Ligase aus T4 infizierten Escherichia coli Zellen wurde durch R.E. Streeck nach Referenz 101 präpariert; Aktivitätsangaben beziehen sich auf den Aktivitätstest in Referenz 102. DNA-Polymerase I, Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, 3-Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe, Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas, Polynukleotid-Kinase aus T4 infizierten Escherichia coli Zellen und alkalische Phosphatase aus Kälberdarm waren Produkte der Firma Boehringer, Mannheim. Proteinase K wurde von E. Merck, Darmstadt und Ribonuklease A von Sigma GmbH, München, bezogen. Exonuklease III stammte von Biolabs Inc., New England, U.S.A.

4.3. Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophoresen wurden nach Referenz 103 durchgeführt. Agarosekonzentrationen (SeaKem Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine) variierten zwischen 0,6 und 2%. Für Agarosekonzentrationen unter 1% wurde als Elektrophoresepuffer anstelle des Tris-Borat-Puffers (104) Tris-Phosphat-Puffer (105) verwendet. Gel und Puffer enthielten 1 µg/ml Äthidiumbromid. Die Gele wurden unter UV-Licht photographiert (106). Elektrophoresen in 4 - 10%-igen Polyacrylamidgelen (1/20 Bisacrylamid, Tris-Borat-Puffer) wurden nach Referenz 45 durchgeführt. Fragmente aus Polyacrylamidgelen wurden durch Ausschneiden der mit Äthidiumbromid angefärbten Gelstücke isoliert. Nach intensivem mechanischen Zerkleinern wurde aus dieser Gelsuspension die DNA durch Elution mit 1M NaCl in 2 ml Einwegspritzen mit eingelegtem Whatman 3MM Papier gewonnen. Zur Reinigung wurde das Eluat im gleichen Arbeitsgang in eine zweite 2 ml Einwegspritze mit eingelegtem Whatman 3MM Papier getropft. Das gereinigte Eluat wurde mit 2,5 Volumenteilen 96% Äthanol versetzt und die DNA bei ca. -70°C im Äthanol-CO₂-Bad ausgefällt. Vor der weiteren Verarbeitung wurde die DNA in 0,3M Natriumacetat pH 5,8 gelöst, erneut mit Äthanol gefällt, zweimal mit 80% Äthanol gewaschen und lyophilisiert.

4.4. Abbau mit Exonuklease III

Die Behandlung mit Exonuklease III erfolgte unter den mit Hind III - pBR 322 - DNA getesteten Bedingungen (Abb. 21).

Die Inkubation erfolgte in 50mM Tris pH 7,8 , 5mM MgCl₂, 10mM Mercaptoäthanol bei 37°C für 30 Minuten mit 0,25 Einheiten Enzym pro µg DNA und einem Volumen von 2,5 µl. Für den Test mit pBR 322 - DNA (Abb.21) wurde der Abbau zu verschiedenen Zeitpunkten durch siebenminütiges Erhitzen auf 68°C gestoppt und die DNA (4 µg/30 µl) im gleichen Puffer zuzüglich der Nukleosidtriphosphate (26µM an dGTP und dTTP und 1,3µM an dCTP und dATP mit 1 µCi [α -³²P]ATP und 1µCi [α -³²P]CTP) mit 0,5 Einheiten Klenow-Polymerase in einem Endvolumen von 30 µl für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Nachdem die Konzentrationen von dCTP und dATP auf 26µM gebracht worden waren, wurde erneut 30 Minuten bei 25°C inkubiert, sieben Minuten bei 68°C inaktiviert und mit Sau 96 I nachgespalten. Nach Behandlung mit Proteinase K (100 µg/ml) wurden die Fragmente in einem 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.5. Isolierung der Kalbsthymus-DNA-Fraktion für die
Ligierungsexperimente zur Konstruktion
der Plasmide 01 - 099

100 A₂₆₀ Einheiten phenolisierte und gegen 10mM Tris-HCl pH 8,0 , 1mM EDTA dialysierte Kalbsthymus-DNA (Boehringer, Mannheim) wurde mit Pvu II gespalten. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch Beimischung von pBR 322 - DNA zu einem Teil des Ansatzes getestet. Die DNA wurde zweimal phenolisiert und das Phenol durch mehrmalige Behandlung mit Äther entfernt. Die DNA wurde in einem 1%-igen Agarose-Rundgel (Tris-Borat-Puffer) mit

einem automatischen, zylindrischen Elektrophoreseapparat fraktioniert (107). Diese Vorrichtung wurde von E.M. Southern (108) entworfen und kann jetzt von Birchover Instruments Ltd. (Letchworth, England) bezogen werden. Fraktionen ohne größere Anteile an 1,706 Satelliten-DNA (Abb. 20) wurden gesammelt und über DEAE-Chromatographie (DE 52, Whatman) gereinigt. 40 A₂₆₀ Einheiten dieser DNA wurden mit Exonuklease III behandelt (4.4.) und nach Phenolisieren gegen 4 x SSC-Puffer dialysiert. 2 A₂₆₀ Einheiten dieser Kalbsthymus-DNA wurden in einem Volumen von 1ml 12 Stunden bei 68°C gehalten und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Spaltung mit Pst I wurde phenolisiert und das Phenol mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. 1 A₂₆₀ Einheit pBR 322 - DNA wurde mit Pst I gespalten, mit alkalischer Phosphatase (4.11.2.) dephosphoryliert und die DNA über Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt. Das so linearisierte und dephosphorylierte Plasmid wurde zusammen mit der Kalbsthymus-DNA, die mit Pst I gespalten worden war, über DEAE-Chromatographie (DE 52, Whatman) von Gelresten befreit und in einer Konzentration von 500 µgDNA/ml für die Ligierung eingesetzt. 0,76 Einheiten DNA-Ligase wurden in einem Volumen von 10 µl für 5 µg pBR 322 - und Kalbsthymus-DNA verwendet. Die Ligierung erfolgte bei 12°C für 12 Stunden und anschließend bei 4°C für 5 Tage. Die Ligierungsprodukte wurden auf eine DNA-Konzentration von 10 µg/ml in 10mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 0,25mM EDTA verdünnt, 10 Minuten auf 68°C erhitzt und 2 Stunden bei 45°C gehalten. Jeweils 10 µl dieser Lösung wurden für die Transformationsversuche eingesetzt (4.7.).

4.6. Subklonierung des 420 Np - Sau 3A I - Fragmentes

Die mit Sau 3A I gespaltene Plasmid 3688 - DNA und die mit Bam HI gespaltene und dephosphorylierte pBR 322 - DNA wurden auf 4%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden nach 4.3. eluiert, über DEAE-Chromatographie gereinigt und, wie unter 4.5. beschrieben, ligiert. Die Transformation erfolgte nach der Beschreibung unter 4.7.

4.7. Transformation und Koloniehybridisierung

Die Transformation von Escherichia coli 490 A (recA met thr leu r_k^- m_k^- , G. Hobom) erfolgte nach der Vorschrift von Dagert und Ehrlich (109). Die Transformationsausbeuten lagen bei 0,5 - 1 x 10⁷ Transformanten pro 1 µg pBR 322 - DNA. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf L-Agarplatten, denen entweder Tetracyclin (Achromycin, Cyanamid, Wolfratshausen) in einer Konzentration von 10 µg/ml oder Ampicillin (Binotal, Bayer AG, Leverkusen) in einer Konzentration von 35 µg/ml zugesetzt war. Vor dem Ausplattieren der Bakterien wurden 100 µl des Transformationsansatzes mit 10 ml L-Medium (98) verdünnt und 2 Stunden bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien in 1 ml L-Medium aufgenommen und in 10 - 50 µl Portionen auf Nitrocellulose-Filter (BA 85, Schleicher und Schüll) ausplattiert. Die Filter waren zweimal in L-Medium, einmal in bidestilliertem Wasser gekocht, autoklaviert und auf die antibiotikahaltigen L-Agarplatten aufgelegt worden. Nach Inkubation

bei 37°C wurden Replikas dieser Filter angefertigt und mit diesen Replikafiltern wurde die Koloniehybridisierung durchgeführt (D. Hanahan und M. Meselson, Cambridge, persönliche Mitteilung).

4.8. Einhaltung der Sicherheitsrichtlinien

Die Klonierungsexperimente wurden unter den "P3/EK 2"-Bedingungen der "National Institutes of Health, Bethesda, Maryland", durchgeführt. Sie sind in den "NIH Guidelines for Recombinant DNA Research" (Fed. Regist. 41, 27917) festgelegt worden. Klonierungsexperimente nach dem 13. Februar 1978 erfolgten unter L3/B2-Bedingungen entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte DNA". Die Konstruktion der hybriden Plasmide 01 - 099 und 3688-1 erfolgte unter L3/B1-Bedingungen.

4.9. Transfer und Hybridisierung nach E.M. Southern

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden entsprechend der Vorschrift von E.M. Southern (110) auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Die Hybridisierung mit ^{32}P markierter DNA erfolgte nach den Angaben in Referenz 107.

4.10. Markierung von DNA durch "Nick Translation"

Die Markierung von DNA mit ^{32}P für Hybridisierungsexperimente entspricht den Angaben von Maniatis (111) und Rigby (112). [α - ^{32}P] Nukleosidtriphosphate wurden von Amersham, England, bezogen.

4.11. Sequenzierung

4.11.1. Herstellung von [γ - ^{32}P] ATP

Die Herstellung von γ - ^{32}P markiertem ATP erfolgte nach Referenz 113 unter Benützung der in 4.2. aufgeführten Enzyme. ^{32}P wurde von NEN Chemicals GmbH, Dreieich, bezogen.

4.11.2. Markierung der Fragmente am 5' - Ende

Die Behandlung der Restriktionsfragmente mit alkalischer Phosphatase erfolgte meistens vor der Auftrennung der Fragmente in Polyacrylamidgelen. Ansonsten wurde gegen 50% Glyzerin, 100mM Tris-HCl pH 8 dialysierte alkalische Phosphatase benützt. Nach Inkubation (60 min., 37°C , in 50mM Tris-HCl pH 8, 3 Einheiten für ca. $5\mu\text{g}$ DNA) wurde dreimal mit Phenol extrahiert und die wässrige Phase mit Äther ausgeschüttelt. Die 5'OH - Enden der Fragmente wurden mit T4 Polynukleotidkinase und [γ - ^{32}P] ATP entsprechend der Referenz 114 radioaktiv markiert.

4.11.3. Sequenzierungsreaktionen nach Maxam und Gilbert

Die Abbaureaktionen wurden nach den Vorschriften von Maxam und Gilbert (113, 114) durchgeführt. Die Produkte von fünf verschiedenen Reaktionen (spezifisch für A+G, G, C, C+T, A+C) wurden auf 8 - 20%-igen Polyacrylamidgelen (mit 7 oder 8,3M Harnstoff) aufgetrennt. Die für Purine spezifische Reaktion entstammt der Arbeit von Gray et al. (115). Die Piperidin-Inkubation erfolgte in zugeschmolzenen, silikonisierten Kapillaren (100 µl) der Firma Brand. Die zur Auftrennung der Reaktionsprodukte benützten Gele der Abmessungen 1,5 x 400 x 900 mm wurden im Laufe der Arbeit durch solche der Größe von 0,25 x 200 x 400 mm ersetzt. 25% der Sequenzen wurden durch eine andere Sequenziermethode (4.11.4.) bestätigt.

4.11.4. Sequenzierung nach Maat und Smith

Die für diese Methode (54) benützten Dideoxynukleosidtriphosphate wurden von der Firma Collab. Research, Mass., U.S.A., bezogen. DNA-Polymerase I und Desoxyribonuklease I wurden in den von den Autoren empfohlenen Konzentrationen eingesetzt; die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte wie für die Sequenziermethode nach Maxam und Gilbert.

4.11.5. Autoradiogramme

Zur Autoradiographie der Sequenzgele bei -70°C wurde der Kodak-Film X-Omat XR5 und bei Bedarf Verstärkerfolien (Ampli Universal oder Cawo SE6, Schrobenthausen)

verwendet. In einigen Fällen wurden die Sequenzgele nach der Exposition langsam bei -20°C und 4°C aufgetaut und nach erneutem Auflegen der zweiten, ausgeschnittenen Glasplatte wieder elektrophoresiert und exponiert.

5.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden repetitive Komponenten aus Kalbsthymus-DNA durch Spaltung mit Restriktionsnukleasen, Hybridisierung und Sequenzierung klonierter und nicht klonierter Fragmente charakterisiert.

Der komplexe Aufbau der Kalbsthymus-Satelliten-DNA mit der Schwimmdichte $1,706 \text{ g/cm}^3$ wurde durch Sequenzierung aufgeklärt. Zwei verschiedene Methoden fanden zur Sequenzierung von 2200 Nukleotiden Satelliten-DNA Verwendung. Die 1,706 Satelliten-DNA ist die erste Satelliten-DNA mit einer Struktur aus sich überlagernden repetitiven Einheiten, deren Sequenz ermittelt wurde.

Die große repetitive Einheit der 1,706 Satelliten-DNA (2350 Np) untergliedert sich in zwei Segmente (B, D) mit vielen Erkennungsstellen für die Restriktionsnukleasen Pvu II und Alu I und in zwei Segmente (A, C) mit vielen Erkennungsstellen für die Restriktionsnukleasen Bcl I und Sau 3A I. Die Pvu - (B, D) und Sau - (A, C) Segmente bilden in einer festgelegten Anordnung (- A - B - C - D -) die große repetitive Einheit. Trotz der unterschiedlichen Restriktionskarte beider Segmenttypen ist der Sequenzaufbau sehr ähnlich: Pvu - und Sau - Segmente lassen sich auf eine Aneinanderreihung von 23 Np - Einheiten zurückführen.

Die Sequenz dieser 23 Np - Einheiten in den Sau - Segmenten zeigt eine Abweichung von 12% gegenüber ihrer Prototypsequenz, die sich aus der Abfolge der

Nukleotide ergibt, die am häufigsten in jeder Position der Einheit vertreten sind. Die entsprechende Divergenz der Pvu - Segmente (22% oder 25%) ist höher als die der Sau - Segmente. Die Prototypsequenz der Pvu - Segmente weicht nur in neun Positionen von der Prototypsequenz der Sau - Segmente ab.

Legt man der Berechnung der Divergenz repetitive Einheiten größerer Länge zugrunde, ergeben sich niedrigere Werte für die Divergenz der Pvu - Segmente. Daraus ließ sich ein detailliertes Modell zur Evolution der 1,706 Satelliten-DNA entwickeln.

Eine Deletion im Pvu - Segment B könnte in analoger Weise zu den spontanen Mutationen im lac i Gen von *Escherichia coli* entstanden sein. Auch im lac i Gen finden an einer Abfolge aus drei identischen Tetranukleotiden bevorzugt Deletionen statt. Die Aufgliederung der Satelliten-DNA in Bereiche unterschiedlicher Divergenz und Länge entspricht der Struktur der AT - reichen "spacer"-Regionen in der 5S rDNA aus *Xenopus laevis*.

Bei Klonierungsexperimenten wurde auch ein zur Klasse der mittelrepetitiven DNA gehörendes Fragment des Rindergenoms isoliert. Seine Sequenz ist teilweise homolog zur Sequenz der U1 - RNA aus Novikoff - Hepatoma - Aszites - Zellen, die eine Rolle beim Spleißen eukaryontischer RNA spielen soll.

Versuche, Randsequenzen der 1,706 Satelliten-DNA zu klonieren, führten nicht zum angestrebten Ziel. Es wurden

aber hybride Plasmide gefunden, die eine weitergehende Analyse anderer Kalbsthymus-Satelliten-DNAs ermöglichten. Die hybriden Plasmide enthielten 1,715 und 1,711 b Satelliten-DNA-Fragmente. Ein kloniertes 1910 Np großes Pst I - Fragment der 1,711 b Satelliten-DNA ist aus Sequenzen, die zur 1,715 Satelliten-DNA homolog sind, und aus anderen nicht homologen repetitiven Sequenzen aufgebaut. Das Verhältnis der 1,711 b Satelliten- zur 1,715 Satelliten-DNA gleicht der Verwandtschaft der 1,711 a Satelliten-DNA mit 1,706 Satelliten-DNA-Sequenzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine große repetitive Einheit von Satelliten-DNA mit einer komplexen Struktur eingehend charakterisiert. Analysen anderer Kalbsthymus-Satelliten-DNAs und einer mittel-repetitiven DNA erbrachten weitere Erkenntnisse über den Aufbau des Rindergenoms.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 R.J. Britten und D.E. Kohne, Science 161, 529-540 (1968)
- 2 S. Kit, J. Mol. Biol. 3, 711-716 (1961)
- 3 E.M. Southern und G. Roizès, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 429-433 (1973)
- 4 P. Philippsen, R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 45, 479-488 (1974)
- 5 W. Hörz, I. Hess und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 45, 501-512 (1974)
- 6 E.M. Southern, J. Mol. Biol. 94, 51-69 (1975)
- 7 J.G. Gall und D.D. Atherton, J. Mol. Biol. 85, 633-664 (1974)
- 8 D.M. Skinner, Bioscience 27, 790-796 (1977)
- 9 K. Fry und W. Salser, Cell 12, 1069-1084 (1977)
- 10 M.R. Botchan, Nature 251, 288-292 (1974)
- 11 D. Brutlag, M. Carlson, K. Fry und T.S. Hsieh, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 1137-1146 (1977)
- 12 E.M. Southern, Nature 227, 794-798 (1970)
- 13 H. Rosenberg, M. Singer und M. Rosenberg, Science 200, 394-402 (1978)
- 14 L. Manuelidis und J.C. Wu, Nature 276, 92-94 (1978)
- 15 T.S. Hsieh und D. Brutlag, J. Mol. Biol. 135, 465-481 (1979)
- 16 M. Carlson und D. Brutlag, J. Mol. Biol. 135, 483-500 (1979)
- 17 M. Pech, T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Nucleic Acids Res. 7, 417-432 (1979)
- 18 C.M. Rubin, P.L. Deininger, C.M. Houck und C.W. Schmid, J. Mol. Biol. 136, 151-167 (1980)
- 19 S.M. Weissmann, Analyt. Biochem. 98, 243-253 (1979)
- 20 K.W. Jones, Nature 225, 912-915 (1970)
- 21 M.L. Pardue und J.G. Gall, Science 168, 1356-1358 (1970)

- 22 W.J. Peacock, A.R. Lohe, W.L. Gerlach, P. Dunsmuir, E.S. Dennis und R. Appels, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 1121-1135 (1977)
- 23 H. Cooke, Nature 262, 182-186 (1976)
- 24 K.B. Moritz und G.E. Roth, Nature 259, 55-57 (1976)
- 25 W. Hörz und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 73, 383-392 (1977)
- 26 B. John und G.L.G. Miklos, in: International Review of Cytology (Hrsg. G.H. Bourne und J.F. Danielli), 58, 1-114 (Academic Press, New York 1979)
- 27 G.L.G. Miklos et al., Chromosoma 76, 339-363 (1980)
- 28 P.M.B. Walker, Nature 229, 306-308 (1971)
- 29 F.T. Hatch, A.J. Bodner, J.A. Mazrimas und D.H. Moore, Chromosoma 58, 155-168 (1976)
- 30 D.M. Kurnit, Human Genet. 47, 169-186 (1979)
- 31 W.F. Doolittle und C. Sapienza, Nature 284, 601-603 (1980)
- 32 L.E. Orgel und F.H.C. Crick, Nature 284, 604-607 (1980)
- 33 W.G. Flamm, P.M.B. Walker und M. McCallum, J. Mol. Biol. 40, 423-443 (1969)
- 34 J.J. Monahan, in: International Review of Cytology, Suppl. 8 (Hrsg. G.H. Bourne und J.F. Danielli), 229-299 (Academic Press New York 1978)
- 35 J.M. Varley, H.C. Macgregor und H.P. Erba, Nature 283, 686-688 (1980)
- 36 G.P. Smith, Science 191, 528-535 (1976)
- 37 J.J. Maio, F.L. Brown und P.R. Musich, J. Mol. Biol. 117, 637-655 (1977)
- 38 R. Appels und W.J. Peacock, in: International Review of Cytology, Suppl. 8 (Hrsg. G.H. Bourne und J.F. Danielli), 69-126 (Academic Press, New York 1978)
- 39 L. Donehower und D. Gillespie, J. Mol. Biol. 134, 805-834 (1979)
- 40 H. Cooke, J. Mol. Biol. 94, 87-99 (1975)
- 41 J.R. Bedbrook, J. Jones, M. O'Dell, R.D. Thompson und R.B. Flavell, Cell 19, 545-560 (1980)

- 42 P. Philippsen, R.E. Streeck, H.G. Zachau und W. Müller, Eur. J. Biochem. 57, 55-68 (1975)
- 43 G. Roizès, Nucleic Acids Res. 3, 2677-2696 (1976)
- 44 G. Macaya, J. Cortadas und G. Bernardi, Eur. J. Biochem. 84, 179-188 (1978)
- 45 R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 89, 267-279 (1978)
- 46 M. Pech, "Konstruktion hybrider Plasmide und Klonieren von Satellit III - DNA aus Kalbsthymus", Diplomarbeit, Universität München (1977)
- 47 J.S. Sussenbach, C.H. Monfoort, R. Schiphof und E.E. Stobberingh, Nucleic Acids Res. 3, 3193-3202 (1976)
- 48 A.H.A. Bingham, T. Atkinson, D. Sciaky und R.J. Roberts, Nucleic Acids Res. 5, 3457-3467 (1978)
- 49 R.J. Roberts, G.A. Wilson und F.E. Young, Nature 265, 82-84 (1977)
- 50 J.S. Sussenbach, P.H. Steenbergh, J.A. Rost, W.J. van Leeuwen und J.D.A. van Embden, Nucleic Acids Res. 5, 1153-1163 (1978)
- 51 A. Kiss, B. Sain, E. Csordas-Toth und P. Venetianer, Gene 1, 323-329 (1977)
- 52 D.E. Garfin und H.M. Goodman, Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 108-116 (1974)
- 53 P. Modrich, Quart. Rev. Biophys. 12, 315-369 (1979)
- 54 J. Maat und A.J.H. Smith, Nucleic Acids Res. 5, 4537-4545 (1978)
- 55 J.O. Bishop, J. Mol. Biol. 128, 545-559 (1979)
- 56 B.F. Vanyushin, S.G. Tkacheva und A.N. Belozersky, Nature 225, 948-949 (1970)
- 57 J. Doscocil und F. Sorm, Biochim. Biophys. Acta 55, 953-959 (1962)
- 58 P. Grippo, M. Iaccarino, E. Parisi und E. Scarano, J. Mol. Biol. 36, 195-208 (1968)
- 59 A.P. Bird und E.M. Southern, J. Mol. Biol. 118, 27-47 (1978)
- 60 S. Hattman, J. Bacteriol. 129, 1330-1334 (1977)
- 61 H. Ohmori, J. Tomizawa und A.M. Maxam, Nucleic Acids Res. 5, 1479-1485 (1978)

- 62 J.R. Miller, E.M. Cartwright, G.G. Brownlee, N.V. Federoff und D.D. Brown, *Cell* 13, 717-725 (1978)
- 63 C. Waalwijk und R.A. Flavell, *Nucleic Acids Res.* 5, 3231-3236 (1978)
- 64 F.C. Kafatos, C.W. Jones und A. Efstratiadis, *Nucleic Acids Res.* 7, 1541-1552 (1979)
- 65 M. Cochet, F. Gannon, R. Iten, L. Maroteaux, F. Perrin und P. Chambon, *Nature* 282, 567-574 (1979)
- 66 E. Lifschytz, *J. Mol. Biol.* 133, 267-277 (1979)
- 67 G.K. Sim, F.C. Kafatos, C.W. Jones, M.D. Koehler, A. Efstratiadis und T. Maniatis, *Cell* 18, 1303-1316 (1979)
- 68 M. Steinmetz, J. Höchtel, H. Schnell, W. Gebhard und H.G. Zachau, zur Veröffentlichung in *Nucleic Acids Res.* eingereicht (1980)
- 69 R. Reddy, T.S. Ro-Choi, D. Henning und H. Busch, *J. Biol. Chem.* 249, 6486-6494 (1974)
- 70 P.H. von Hippel, in: *Biological Regulation and Development*, Vol. 1 (Hrsg. R.F. Goldberger), 279-347 (Plenum Press, New York 1979)
- 71 H.S. Shapiro, in: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, *Nucleic Acids*, Vol. II (Hrsg. G.D. Fasman), 241-311 (CRC Press, Cleveland 1976)
- 72 M.B. Mann, R.N. Rao und H.O. Smith, *Gene* 3, 97-112 (1978)
- 73 F. Gautier, H. Bünemann und L. Grotjahn, *Eur. J. Biochem.* 80, 175-183 (1977)
- 74 H. Kopecka, G. Macaya, J. Cortadas, J.P. Thiéry und G. Bernardi, *Eur. J. Biochem.* 84, 189-195 (1978)
- 75 N.V. Fedoroff und D.D. Brown, *Cell* 13, 701-716 (1978)
- 76 R.E. Wagner und M. Radman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3619-3622 (1975)
- 77 D. Ghosal und H. Saedler, *Nature* 275, 611-617 (1978)
- 78 P. Farabaugh, U. Schmeissner, M. Hofer und J.H. Miller, *J. Mol. Biol.* 126, 847-857 (1978)
- 79 D.J. Galas, *J. Mol. Biol.* 126, 858-863 (1978)
- 80 E.H. Davidson und R.J. Britten, *Quat. Rev. Biol.* 48, 565-613 (1973)

- 81 T. Maniatis, E.T. Butler III, E.F. Fritsch, R.C. Hardison, E. Lacy, R.M. Lawn, R.C. Parker und C.-K.J. Shen, in: Eucaryotic Gene Regulation, ICN UCLA Symposia, Vol. 14 (Hrsg. R. Axel, T. Maniatis und C.F. Fox), 317-333 (Academic Press, New York 1979)
- 82 R.A. Flavell, R. Bernhards, G.C. Grosveld, H.A.M. Hoeijmakers-Van Dommelen, J.M. Kooter, E. De Boer und P.F.R. Little, in: Eucaryotic Gene Regulation, ICN UCLA Symposia, Vol. 14 (Hrsg. R. Axel, T. Maniatis und C.F. Fox), 335-354 (Academic Press, New York 1979)
- 83 F.D. Costantini, R.H. Scheller, R.J. Britten und E.H. Davidson, Cell 15, 173-187 (1978)
- 84 M.W. Young, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6274-6278 (1979)
- 85 E. Strobel, P. Dunsmuir und G.M. Rubin, Cell 17, 429-439 (1979)
- 86 S.S. Potter, W.J. Brorein, Jr., P. Dunsmuir und G.M. Rubin, Cell 17, 415-427 (1979)
- 87 J.R. Cameron, E.Y. Loh und R.W. Davis, Cell 16, 739-751 (1979)
- 88 S.W. Stanfield und J.A. Lengyel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6142-6146 (1979)
- 89 J.E. Mayfield et al., Chromosoma 76, 277-294 (1980)
- 90 M.R. Lerner und J.A. Steitz, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 5495-5499 (1979)
- 91 M.R. Lerner, J.A. Boyle, S.M. Mount, S.L. Wolin und J.A. Steitz, Nature 283, 220-224 (1980)
- 92 A.S. Krayev, D.A. Kramerov, K.G. Skryabin, A.P. Ryskov, A.A. Bayev und G.P. Georgiev, Nucleic Acids Res. 8, 1201-1215 (1980)
- 93 F. Harada und N. Kato, Nucleic Acids Res. 8, 1273-1285 (1980)
- 94 A. van Ooyen, J. van den Berg, N. Mantei und C. Weissmann, Science 206, 337-344 (1979)
- 95 E. Pöschl und R.E. Streeck, zur Veröffentlichung in J. Mol. Biol. eingereicht (1980)

- 96 F. Bolivar, R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa und S. Falkow, *Gene* 2, 95-113 (1977)
- 97 T. Tanaka und B. Weisblum, *J. Bacteriol.* 121, 354-362 (1975)
- 98 J.H. Miller, in: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, (New York 1972)
- 99 H.C. Birnboim und J. Doly, *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523 (1979)
- 100 R.J. Roberts, *Gene* 8, 329-343 (1980)
- 101 N.E. Murray, S.A. Bruce und K. Murray, *J. Mol. Biol.* 132, 493-505 (1979)
- 102 B. Weiss, A. Jacquemin-Sablon, T.R. Live, G.C. Fareed und C.C. Richardson, *J. Biol. Chem.* 243, 4543-4555 (1968)
- 103 C. Aaij und P. Borst, *Biochim. Biophys. Acta* 269, 192-200 (1972)
- 104 A.C. Peacock und C.W. Dingman, *Biochemistry* 6, 1818-1827 (1967)
- 105 U.E. Loening, *Biochem. J.* 113, 131-138 (1969)
- 106 W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, *Nature* 258, 450-452 (1975)
- 107 M. Steinmetz, H.G. Zachau und B. Mach, *Nucleic Acids Res.* 6, 3213-3229 (1979)
- 108 E.M. Southern, *Analyt. Biochem.* 100, 304-318 (1979)
- 109 M. Dagert und S.D. Ehrlich, *Gene* 6, 23-28 (1979)
- 110 E.M. Southern, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975)
- 111 T. Maniatis, A. Jeffrey und D.G. Kleid, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1184-1188 (1975)
- 112 P.W.J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes und P. Berg, *J. Mol. Biol.* 113, 237-251 (1977)
- 113 A.M. Maxam und W. Gilbert, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 560-564 (1977)
- 114 A.M. Maxam und W. Gilbert, zur Veröffentlichung in *Methods of Enzymology*, Vol. 65, eingereicht (1980)

- 115 C.P. Gray, R. Sommer, C. Polke, E. Beck und
H. Schaller, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75,
50-53 (1978)
- 116 H.O. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. 81,
419-423 (1973)
- 117 "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids,
Polynucleotides and their Constituents",
Eur. J. Biochem. 15, 203-208 (1970)
- 118 "Abbreviations and Symbols, a Compilation",
Eur. J. Biochem. 74, 1-6 (1977)

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schicht- dicke
Abb.	Abbildung
Bisacrylamid	N,N'- Methylenbisacrylamid
BAMD	3,6 - Bis(acetato-mercurimethyl-)Dioxan
cpm	Impulse pro Minute
Np	Nukleotidpaar
SSC	Standard-Saline-Citrat (150mM NaCl, 15mM Natriumcitrat)

Die Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen entsprechen den in Referenz 116 angegebenen Empfehlungen. Alle anderen Abkürzungen richten sich nach den Empfehlungen der "IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature", wie sie in den Referenzen 117 und 118 dargelegt sind.

LEBENS LAUF

Am 4. November 1952 wurde ich in Heidenheim (Baden-Württemberg) geboren. Im Anschluß an die Volksschule in Königsbronn besuchte ich das Hellenstein-Gymnasium in Heidenheim. Im Jahr 1967 wechselte ich auf das Chiemgau-Gymnasium in Traunstein (Bayern) über, wo ich 1971 die Reifeprüfung ablegte. Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im November 1972 das Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach der Vordiplomprüfung studierte ich ein Jahr an der "University of Edinburgh" Mikrobiologie, Molekularbiologie und Zoologie. Ich legte die "degree examinations" ab und setzte mein Studium an der Universität München fort. Seit dem Sommersemester 1976 studiere ich Biologie und Humanmedizin. Nach den Diplomhauptprüfungen fertigte ich von 1976 bis 1977 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau und Herrn Dr. R.E. Streeck eine Diplomarbeit an mit dem Thema: "Konstruktion hybrider Plasmide und Klonieren von Satellit III - DNA aus Kalbsthymus".

Seit Dezember 1977 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau und Herrn Doz. Dr. R.E. Streeck im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München an der vorliegenden Dissertation.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig
angefertigt und keine anderen als die angegebenen
Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

München, den 12. Mai 1980

